## (19)日本国特許庁 (JP)

識別記号

## (12) 公表特許公報(A)

ΓĮ

庁内整理番号

## (11)特許出願公表番号

## 特表平7-503622

## 第1部門第1区分

(51) Int.Cl,\*

(43)公表日 平成7年(1995)4月20日

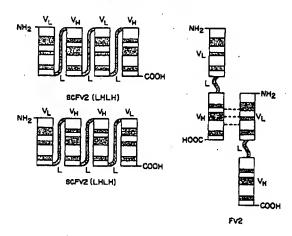
C 1 2 P 21/08 C 0 7 K 16/00 16/18 16/32	8318	1–4B 3–4H 3–4H 3–4H	
	9050	)-4B ( 審査請求 未請求	C12N 15/00 ZNA A 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く
	特顯平6-514437 平成5年(1993)12月10日 平成6年(1994)8月11日 PCT/US93/12	(71	()出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー アメリカ合衆国、ミシガン 48640, ミッ ドランド、アポット ロード、ダウ セン ター 2030
(87)国際公開番号 (87)国際公開日 (31)優先権主張番号	WO94/13806 平成6年(1994)6月23日 990,263	(72	2)発明者 メゼス, ピーター エス. アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25
and the second s	1992年12月11日 米国 (US) EP(AT, BE, CH,	DE.	り発明者 ゴーリー, プライアン ピー. アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッ ドランド, オーチャード ドライブ 3713
	GB, GR, IE, IT, I B), AU, CA, JP	LU, M (74)	)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

## (54) 【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

## (57)【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を 有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖 抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチ ドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体 は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結 されている可変軽鎖ドメインを有する。

## 共有及び針共有結合型一本額Fv多量体の図別



## 仲数(内容に変更なし)

## 請求の範囲

- 1. 2以上の一本領抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する観和性を存しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共存結合されており、そして各フラグメントは:
  - (a) 種類可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
  - (b) 重額可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド:及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと 連結せしめる第二のペプチドリンカー:

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

- 2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列 iou Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu
- を有する、請求項し記載の多価の一本頭抗体。
- 3. この軽級可収額域が、図3に示すものと実質的に関じアミノ 酸配列を有しており、そしてこの電験可収領域が、図5に示すもの と実質的に関じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の 一本額依体。
- 4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸 配列を有する、請求項 I 記載の多価の一本銭抗体。
- 5. 多価の一本級抗体をコードする DNA配列であって、この多価の一本級抗体が 2 以上の一本類抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する観和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:
  - (a) 軽頻可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド:

## 浄鬱(内容に変更なし)

## 明 細 書

多価の一本銀抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応なして免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽額と重額とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽額は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、實額は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽額及び實額の両者に由来する、それぞれV。及びVsと称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データーは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(PR)によりフランクされている3つの相特性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。この CDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、 IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を存しており、他方、五量体 IgNクラスは10の同一の結合部位を存している。

周一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

(b) 重領可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド:及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと 連結せしめる第二のペプチドリンカー:

を含んで成る。 DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実 質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が 図3のそれと実質的に同じである、請求項5配数の DNA配列。

断及び始度利の両方として有用とされている。モノクローナル杭体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインピポ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗ーマウス抗体応答に基づき制めされている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の程に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換 DNA方法論により作られている。例えば、 Sahagenら、J、[maunol.、137:1066-1074(1986): Sunら、Proc.Natl、Acad、Sci.USA、62: 214-219 (1997): Nishimuraら、Cancer Res.、47:999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc.Natl、Acad、Sci.USA、84:3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その裏理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造金体のうちの主要部分を構成するPC 領域を保育し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利 用のため、傾的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体様分子を得 ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望 される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を 有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗康と相互作用するのは軽頻及び重頻の可変復被であるため、一本の $V_{\rm L}$  と一本の $V_{\rm R}$  とにより一本領抗体フラグメント(scPvs) が作られており、これは8つの CDRを含み、それらはペプチドリンカ

ー(米国特許第 4,846.778号)により連結された $V_L = L = V_R$ ポリベプチドモ成しており、ここでしはベプチドリンカーを扱じている。 $V_L \succeq V_R$ ドメインが配向 $V_R = L = V_L$ であるSCPVが米国特許第 5,182,405号に紹示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscPvは一つ のそれを有するため、scPvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて 低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認 臨特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscPvの構築 体を獲得することが有利であろう。加えて、領的組織上の別々のエ ビトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ペ ース順増を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体精理を可 能とする二価特異的である多価scPvを提得することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の V 』 と一本の V 。ドメインとを有する一本版抗体フラグメントは、第二 ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合 銀和力 を維持している多価一本域抗体を形成できうることが発見された。 一郎様において、本発明は抗原に対する 銀和性を育する多価一本類 抗体であり、ここでこの多価一本級抗体は 2 本以上の経域可変 ドメインと 2 本以上の重域可変 ドメインとを含んで成り、ここでも可変 ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の意様において、本発明は2本以上の一本線抗体フラグメント を含んで成る多価一本線抗体であり、各フラグメントは抗原に対す る観和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチ ドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

(a) 軽額可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

図5は CC49V。のアミノ酸配剤を示す。

図 6 は p49LHLHにおけるCC49一本鉄坑体LHLHのヌクレオチド配列 及びアミノ酸配列を示す。

. 図7は p49LHHLにおけるCC49一本級抗体LHHLのヌクレオチド配列 及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL301T及びpSL301HTの構築を示す。

図9はプラスミド p48LHHLの構築を示す。

図10はプラスミド p49LHLHの構築を示す。

図11はCC491gG、CC49scPv2及びCC49scPvを用いた、競合因子としてビオチニル化 CC491gGを用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の数示金体を引用することで本明細書に組入れる。

核酸、アミノ酸、ベプチド、保護基、活性基等を貼すとき、それらは1UPAC 1UB (Commission on Biological Nomenciatura) 又は関連分野の実際に従って貼している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 $V_k - L - V_k$ により扱わされる、ベプチドリンカー(L)により $V_k$ ドメインに連結された $V_k$ ドメインを含むポリペプチドを意味する。 $V_k$ と $V_k$ ドメインとの順序は逆であってよく、 $V_k$  -  $L - V_k$  として表わされるポリペプチドが獲得できうる。(ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本類抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した 2 以上の一本類抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

Yı-L-Yn-L-Yı-L-Yn; Yı-L-Yn-L-Yn-L-Yı; Yn-L-Yı-L-Yı; 又は

(b) 重組可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド;及び

(c)この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと 連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。

別の想様において、本発明は、多価一本類抗体をコードする DNA 配列を提供し、ここでこの多価の一本額抗体は2本以上の一本額抗 体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する観和 性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリン カーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

(a) 軽銀可変ドメインを含んで成る第一ポリベプチド:

(b) 重領可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド:及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと 適結せしめる第二ペプチドリンカー;

・を含んで成る。

この多価一本段抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、 サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗 体フラグメントの構築を可能とする。多価一本銭抗体は、結合部位 が2 種類の抗原決定差でありうる多価一本銭抗体の構築も可能とす るであろう。

## 図面の簡単な説明

図1は、V<sub>1</sub>-L-V<sub>0</sub>-L-V<sub>1</sub>-L-V<sub>1</sub>(LHH)とV<sub>3</sub>-L-V<sub>1</sub>-L-V<sub>1</sub>(LHH)の形態を有する共有結合型ー本鎖抗体及び非共有結合型Pv-本線抗体(Pv2)を示す。

図2は CC49V、のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49VL のアミノ酸配列を示す。

図 4 は CC49V』のヌクレオチド配列を示す。

Va-L-VL-L-VL-Vn

の V 、と V 』 ドメインの 関序を有する二価の一本類抗体を形成してよい。

三価以上の一本類の多価抗体は、追加のペプチド間リンカーによって二価の一本類抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な整線においては、V。とV。ドメインの数は等しい。

本発明は、

V<sub>n</sub>-L-V<sub>n</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>又はV<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>n</sub>-L-V<sub>n</sub> で表示されうる多毎の一本鎖銃体も提供する。

V<sub>1</sub>-L-V<sub>n</sub>-L-V<sub>1</sub>-i-V<sub>n</sub> (LHILH) 及びV<sub>1</sub>-L-V<sub>n</sub>-L-V<sub>n</sub>-i-V<sub>1</sub> (LHHL) の形態を有する共有結合型-本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型Pv-本鎖抗体(Pv2) も図1に示している。

本発明において利用するための一本頭抗体フラグメントは任意の 抗体の軽額及び/又は重額可変ドメインに由来しうる。好ましくは、 その軽額と重額可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本域抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、 同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して 特異的でありうる。

一本類の多価抗体についての DNA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適当な DNA配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の領準の手順によって獲得できうる。例えば、 The U.S. Department of Health and Human Services により公開された KabatらのSequences of Protsins of Immunological Interest 第4版 (1991) は、今日まで述べられているほとんどの抗体可要領域の配列を期示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする DNAの起

悪として、逆転写酵素仲介合成によりaRNAから獲得したcDNA配列を 利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広 範囲にわたるハイブリドーマから獲得できうる。例えば、カタログ ATCC Call Lines and Hybridomas. Amarican Type Cultura Collection, 20309 Parklawn Drivs, RockvIlla Md., USA (1880) を参照 のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノ クローナル抗体を分泌するハイプリドーマがそのCollectionより入 手でき、そして本発明において利用できる。これらの知放系及びそ の他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、 又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体 タンパク質を獲得するように利用できううる。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家書動物とそして最 も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫 原は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリ ンペットへモシアニン(KLH) の如きの抗原に対するこのハブテンの 抗原性抱合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2~3週 間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し住射によって好適に実施さ れうる。通常、最後の負荷の3日後、膵臓を取り出し、そしてmRNA が当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できうるようにハイブ リドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。 踩脳の抗体が復得でき、そしてそのアミノ改配列だけを知り得た

ら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV、及びV。ドメインは好ましては、1990 年3月3日に公開された PCT出願 WO 80/04410 及び1989年1月28 日に公開された PCT出願 WO 89/00692 に開示されている、建瘍関 連縮タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。 より好ましいのは、 PCT公開 WO 90/04410 及び WO 88/00682 に

おいてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV。及 びVェドメインである。CC48のV、モコードするヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) は図1に示すものと実質的に同じである。CC48の V. のアミノ酸配剤(SEQ ID NO: 2) は図 2 に示すものと実質的に 同じである。CC49のVw をコードするヌクレオチド配列(SBQ ID No:: 3) は図 8 に示すものと実質的に同じである。CC49の V " をコード するアミノ酸配列(SEQ 10 NO: 4) は図 4 に示すものと実質的に図 じである。

本発明の抗体フラグメント及び多偏の一本順抗体を形成するため、 適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。 V。とV。ドメ インを連絡するための適当なリンカーは、ViとV、ドメインが、 一本領ポリペプチドであって完全抗体のもとの構造に非常に類似す る三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している 完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド値へと振りたた まれることを可能にするものである。scPvを連結するための適当な リンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのVu及びV。ドメ インが三次元律造であって、その各フラグメントが、そのイムノグ ロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持 するような三次構造を有するように、2以上のscPvを連結すること の可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内 容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第 4,946,778号に 開示の方法により獲得できうる。この第 4,846,778号に記載の方法 により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする 遺伝子配列が獲得できうる。

好ましくは、VェとVェドメインを連結してscPvを形成せしめる ペプチドリンカーと、2以上のscPvを連結して多価の一本額抗体を 形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配剤を有

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の 抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結 合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好速なリンカーは、Pantollanoらの9iochem., 30, 10117-10125 (1991)に関示されている2050と称されているヘリカルリンカーを恭 碇とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にある Xho I 部位 と、他端にあるH10dⅢ部位により指定されるコドンを理由に変えら れている。

好適なリンカーのアミノ融配列(SEQ IO NO: 5) は下記の造りで ある:

Lau-Sar-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu .

このリンカーは一般に10~50のアミノ酸残差である。好ましくは、 このリンカーは10~30のアミノ散残差である。より好ましくは、こ のリンカーは12~30のアミノ酸残器である。最も好ましくは、この リンカーは15~25のアミノ静発基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他 のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合 性な種に由来するレブリコンとコントロール配列とを含む。このベ クターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選 別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大 羅爾 (B. coli) はp9R322を用いて容易に形質転換される ( 9olivar ら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molscular Cloning, Cold Spring Harbor Press. Naw York, 第2版 (1889) )。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できうる。S、セレビ ジエ (S. cerevisiae) 又は一般のパン酵母が真核酸生物の中で最も

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシア パストリス(Pichia pastoris) が有用である。多細胞生物、例えば ATCCより入手できる SP2/0 又はチャイニーズハムスター卵巣に由 来する細胞の培養物も宿主として利用できうる。哺乳動物細胞にと って適当な典墅的なベクタープラスミドは pSV2neo及び pSV2gpt (ATCC); pSVL及びpKSY-10 (Pharmacia). p9PV-1/pML2d (International Giotechnology. (nc.) である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及 び宣校ウィルス発理ペクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本級の各価抗体をコードするインサ ートは、その挿入連結郎において適合性制限部位を有し、且つその 制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクタ 一及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、 次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法に よりリゲートする..

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝 子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリベ プチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエ ンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、 不改性物質としてそのポリペプチドが客様することを避けるために 輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レブリコン及びコント ロール配列に加えて、一本額ポリペプチドの最適な合成にとって追 加の要素が必要とされうる。これらの要素にはスプライスシグナル、 並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含ま れる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを 助長するために必要とされうる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を構たす

ように簡単に改更されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における数示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば選利耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。『宿主細胞』とは、独良 DNA技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されるる細胞である。裏判耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば裏剤耐性マーカーの存在は、夾雑染生物が培養培地の中で類種するこを筋ぐうえで利用されうる。この思想において、双型を必り接ていることを意図を発音された表現を必要して細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の領単技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本類の多価技体は限外違過により議解されるなら、精製はその細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外は過、抗原アフィーティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲルは過を実行することにより違成されうる。不溶性であり、足つ起析体(refractile bodies)、遺除対入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、対入体を単離するための違心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジンーHC1による可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって特製できうる。

一本項の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば 競合アッセイ、酵素結合免疫収着アッセイ(ELISA) 及びラジオイム ノアッセイ(RIA) により創定できうる。

IGP 等電点電気泳動

Kbp 牛口塩基效

LB Luria-Bertani 培地

Mab モノクローナル抗体

MES 2 - (N-モルホリノ) エタンスルホン酸

WW 分子量

NBT ニトロブルーテトラゾリウムクロリド

オリゴ オリゴヌクレオチド

PAG ポリアクリルアミドゲル

PAGE ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PBS リン酸級衝食塩水

PCR ポリメラーゼ連鎖反応

pSCFV SCPVをコードする DNA配列を含むプラスミド

RIGS ラジオイムノガイド外科

RIT ラジオイムノ治療

scPv 一本鎖Pvイムノグロブリンフラグメントモノマー

scPvs 共有結合した一本領Pvイムノグロブリンフラグメントダ

イマー

SDS ドデシル破験ナトリウム

TBS トリス経箇会塩水

トリス (トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)

TTBS ツィーン20洗浄液

V。 イムノグロブリン重額可変ドメインV。 イムノグロブリン軽額可変ドメイン

抗 体

<u>CC49</u>: ヒト腫瘍間連絡タンパク質72(TAG-72) に特異的なネズミモノクローナル抗体;ATCC No. H89458として奇託。

本発明の多価の一本銀坑体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本銀坑体の利用は、大きめのフラケメント又は抗体分子会体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は拍療用途のため、この多価の一本顔抗体は!又は 複数の抗体フラグメントが振的組織に対して特異的であるように、 及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは抬療因子に対し て特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な真理組成物も考慮しており、ここでこの傾的抗原はしばしば細胞の表層上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本級抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって抱合されうる。本発明の類理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって講製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により 更に明らかにする。

## 略語

BC!P 5 - プロモー 4 - クロロー 3 - インドイルホスフェート

t 基型 qd

Bis-Trisプロパン (1, 3-ピス(トリス(ヒドロキシメチル) ーメチルアミノ) プロパン)

BSA 牛血清アルブミン

CDR 相辅性決定領域

BLISA 酵素結合免疫収着アッセイ

Fv2 非共有一本級Fvダイマー

CC49PAB : 重額のN-末端領域に連結している完全軽額より成る CC49の抗原結合性領域。

CC49scPv:ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本規抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scPv。Pvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば CC49Pv8は六量体の多量体を意味する。

CC48 a c F v 2: 3 つのリンカーにより連結されている、2 本のCC48 V L ドメインと 2 本の V m ドメインとより成る共有結合型一本線抗体フラグメント。 V L (L) と V m (H) ドメインとを連結し合わせるのに6 つの可能な順序の組合せかある: L HL H, L L H H, HL L H, HL L R U H H L L L L H H, HL HL 及 U H H L L L

## ブラスミド

<u>pSCPV\_UHN</u>: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49 の可変軽額とCC49可変重額とより成るscPvについてのコード配列を 含むプラスミド。

<u>P49LHLH 又は P49LHHL</u>: CC49scPv2 LHLH又はLHHL生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

## 実施例

## 一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細容に組入れる。Sanbrookら、 Molecular Clooing, Cold Spriog Harbor Press, New York 第2版 (1888) 及び Ausubelら、Current Prtocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手頭である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

## オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準のターシアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、 Appiiad Biosystems (Foatar City. CA) 由来のModei 380A又は Modei 391 ONA合成装置のいづれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で 8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバボレーションを介して除去し、そしてその組偽合物を30~40μ1 の減菌水の中に再配配させた。 ポリアクリルアミドー尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外 (UV) 光を用いて可視化させた。 DNAバンドをゲルから切り出し、そして 1回1の100mM のトリスーHCI. pH 7.4、500mMのNaCI. 5 mMの2DTAの中で65℃で 2 時間かけて溶解させた。 最終特製は、 DNAを SepーPac(商標) Cー18カラム (Millipore, Badford, MA) に適用し、そして結合したオリゴを90%のメタノールで溶離させることによって行った。 その溶液の体験を約50mlに下げ、そして DNA強度を260nm (ODseed) での光学密度を翻定することにより映定した。

## **制限酵素消化**

制限酵素消化は全て、Bethesda Rasaarch Laboratorias (Gaitharsburg, MD), Naw England Biolaba, Inc. (Baverly, MA) 又はBoehringar Mannheia (BM, Indlanapolls, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の強機する手順に従って実施した。 清化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気診動 (PAGB) により分離させた。そのゲルをエチジウムプロミドで染色し、その DNAバンドを短放UV光により識別化させ、次いでその DNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5 mMのトリス、 2.5mMの酢酸、1 mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ (Union Carbide Corp., Chicago) の中に入れ、そして Max Submarine電気診動装置(Hoafer Scientific Instrumants,

より測定した。 scPv2の結合は、発色の同時低下を伴うピオチニル 化CC49の結合の低下をもたらした。

## SDS-PAGE及びウェスタンプロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20μi)を、非産元用サンプル関数パッファーSeprasoi I(Intagratad Separation Systams(ISS), Natick, MA) の中で5分間兼添することにより関数し、そして10-20% 勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigeiにその製造者の仕様æ(ISS) に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2ーゲル装置(ISS) を用い、ゲル当り55mAで、一定の電流で約75分行った。ゲルをクマジーブリリアントブルーRー250 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも I 時間染色し、次いで駅色した。分子量標準品は予め染められており (Mid Ranga kit. Divarsifiad Biotech, Nawton Center, NA)、そして下記のタンパク質を含んでいた:ホスホリラーゼも、グルタメートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、オバルブミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、Bーラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、55,000、43,000、36,000、29,000、19,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュブリケートのゲルも泳動した。 電気泳動後、ゲルの一方を帰極パッファー# 1 (0,3 Mのトリスー RCi. pH10.4)の中で15-20分平衡にした。Immoblion-P. PYDP (ポリ ビニリデンジクロリン) 膜 (Miliipore, Bedford, MA) をメタノー ルで2分処理し、そして水の中に2分硬した。その膜を次に陽極パ ッファー# 1 の中で3分平衡にした。 Milliblot-SDE 装置(Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。 一箇の隔極パッファー# 1 を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM 遊紙のシートを陽極パッファー# 1 の中に浸し、そしてその電 CA) を用いて熔離させた。サンプル容量を Speed Vac濃線器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。 DNAをエタノール沈殺させ、そ して減壊水の中で再熔解させた。

## 群素結合免疫収費アッセイ(ELISA)

Johnsonら、 Can, Ras., <u>46</u>, 850-857 (1986)に実質的に記載 の通りに質製した TAG-72抗原を、ポリピニルクロリド98穴マイク ロタイタープレート (Oynatech Laboratorias, inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレー トを PBS中のi%の BSAで31℃で!時間プロックし、次いで200μ1 の PBS、0.05%のツィーン50で3回洗った。25μiの試験抗体及び 25μ [のビオチニル化CC49 (1/20,000希釈率の 1 mg/mlの溶液) をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュペート した。プレートに結合した TAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプ トアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、会 針な抗体又はピオチニル化CC48がないように、しかも8cPvによる競 合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定し た。陽性コントロールは5μg/mlのCC49及び10μg/mlのCC49Fab とした。該性コントロールは PBS中の 1 %の BSA及び/又は渡LBと した。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼ の抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50μl (Souther Blotechnolgy Associatea, Inc., Birmingham, AL)を加え、そして そのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更 に 3 団洗った。50μ | のパラーニトロフェニルーホスフェート溶液 (Kirkegaard & Perry Laboratories, inc., Gaithersburg, MD) & 加え、そして発色反応を最低20分行わせた。 scPv2結合の相対量を マイクロブレートリーダー (Molecular Davices Corporation, Manlo Park, CA)を用い404 - 450 nmでの光学密度スキャニングに

価面の上に滑らかに置いた。陽極パッファー#2(25mMのトリス、pH10,4)の中に慢した別の雄抵を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陰極パッファー(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCI、pH9,4)の中に痩した違紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ポルトに範囲した)を用いて30分で達せられた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20alのプロッキング溶液(トリス接衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルプミン(BSA)(Sigma、St. Louls、MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPlerca Chamical (Rockford、iL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その碼合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限 1 時間、周囲温度でプロックし、そして20mlづつの 0.5%のツィーン20洗浄液(TTBB)を用いて5分間3回洗った。TTBBを開製するには、0.5mlのツィーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したプロープ抗体は20mlのビオチニル化 PAID 14溶液とした(10μg/20mlの抗体バッファー)。抗体バッファーは 100mlのTTBS当り1gの BSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プロープした後、その顔を上配の通りTTBSで3回洗った。

次に、その護を超級温度において30~60分、抗体バッファーの中で1:500 希家本のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアピジン(Southarn Biotechnology Associatas, Birmingham, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後様り返した。発色反応の前に、減を炭酸アルカリバッファー(20mi)の中で2分洗った。このバッファーは 0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMの MgCli・HiO、pH9.9とした。アルカリホスファターゼにとっ

ての基質を作るため、ニトロプルーテトラゾリウム(NBT) クロリド (50mg, Signa) を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。 5 ープロモー4ークロロー3ーインドイルホスフェート (BCIP)(25mg. Sigma)を別に 100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。 5 -プロモー 4 - クロロー 3 - インドイルホスフェート (8C1P)(25gg, Signa)を別に 100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これ らの溶液も、 Promegeよりウェスタン発色剤として市販されている。 発色のため、それぞれ 120#1を上配のアルカリ溶液に加え、そし て15分間反応させ、次いで発色膜からそれらを水で洗い流した。 ピオチニル化 PAID 14

PAID 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄 託されているネズミの抗ーイディオタイプ抗体(lgC2a, Kアイソタ イプ)である。 FAID 14を Nygene Protein Aアフィニティーカラ ム(Yonkers, NY) を用いて精製した。製造者のプロトコールに従っ たが、ただし容様パッファーとして 0.1Mのクエン酸ナトリウム、 pH 3.0を用いた。画分を 1.0Mのトリス-HCl pH 9.0を用いてpH~ 7に中和した。ビオチニル化反応は下配の通りに設定した。PAID 14 (1 mg、水の中で 100 m 1) を 100 m 1 の 0.1MのNa2CO2, pH 9.6 と混合した。ビオチニルーセーアミノーカプロン酸N-ヒドロキシ スクシニミドエステル (81otin-X-NHS)(Calbiochem. Lajoila, CA) (2.5mg) を 0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。 Blotin-X-NHS 溶液(20μ1)を FAID 14溶液に加え、そして22 ℃で 4 時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Phermecia Supsroaa 12 HR10/30カラム (Piscatawey, NJ) を用いてゲル濾過 により除去した。 0.8 μ ] /min の流速で、ピオチニル化 FAID 14 は 16.8minのピークで出現した。このピークを構成する面分をプー ルし、そして 4 ℃で保存し、そして CC48V』及び V\*CDRにより決定

これらの値は、D. B. Wetlaufer, Advences in Protein Chemistry. 17巻、 375~378 耳に記載されている情報に基づいている。

## 高性能胶体クロマトグラフィー

CC48scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィ - にはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いた LK8 HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、 2152型制御器、 278nmの吸光度に設定された UV CORD ST 2236 型 検出装置および2211数 SuperRac frection collectorで構成されて いる。

## サプユニットの PCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR) はすべて、 150ピコグラム (pg) の プラスミド長的 (pSCFYUHW) : 100ピコモルのプライマー: 1 4 1 のParkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州。ノーウォーク 所在の P8C社)の Ampli-Tagポリメラーゼ: 18μLの 10mM dNTPお よび10μしの10×緩衝液 (両者ともに PECキットに提供されている): ならびに合計容積を 100μ Lにするのに充分な水で構成された反応 混合物で行った。 PCR反応はメーカーが配載しているのとほとんど 同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー (thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、そのよサイクルは、 94℃で20~45秒間の DNAの宏性: 52~80℃で 0.5~ 1.5分間のアニ ーリングおよび72℃で 0.5~ 2.0分間の伸長で構成されている。オ リゴヌクシオチドのプライマーは、Applied Biosystams社(米国。. カリフォルニア州、ホスター・シティ所在) の360A型もしくは 381 型 DNA合成器で合成し次いで上記のようにして積製した。 リゲーション

100ngのベクター DNAおよび対応する1:1化学量論的当量のイ ンサート DNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国。

されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

## 等電点電気泳動(IEP)

事電点(pi)は、DNASTAR(Wedison、Wi)を介して入手できる PROTEIN-TITRATE という名のコンピュータープログラムを用いて推 定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、plに加え てAW確が得られた。 Cys残器は電荷に寄与するため、 Cysについて の計数は0に調整し、なぜならそれらは金てジスルフィド結合に関 与するからである。

実験的にplを、[sogelアガロース lEFプレート、pH被 3~10(PMC Bioproducts, Rockland, ¥8)を用いて決定した。81orad Bio-phoresis 水平電気泳動セルモ、 JEFを行うのに用い、両者の製造者の仕 様春に従った。電気泳動条件は、 500ポルト (限界) 、20mAの電流 及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は 90mlaで完了した。 IEF 標準品は8ioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、8-ラクトグロブリンB、牛供酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラ ーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、 3 レンチルレク チン及びチトクロームCを含み、それとのpi値は4;65。5.10。6.00。 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.80である。 ゲルを、 PMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。 CC49抗体権の定量

IgG. scPv2の程および単量体scPvを含む特製CC48抗体はすべて、 適合している 1,0cm光路長の石英製キュベット(Helime社)および Parkin-Blmar UV/VLS 分光光度計552A型を用いて、タンパク質希 釈液の 280mm放長光の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数 (E.)は、各抗体について、下記式を用いて測定した。

E = =(Trp数) ×5,500 +(Tyr数) ×1,340 +((Cys)2 数) ×150 +(Phe数)×10

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用 い、酸メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物 (全容積20μL)は最初18℃でインキュペートし、次いで一夜4℃ まで徐々に治却した。

## 形質転換

形質転換は、 100 / LのStratagena社の大腸菌 (E.coli) AG 1 コ ンピテント細胞(米国。カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStretagena社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーシ ョン反応物由来のDNA(1~5μL)を使用した。形質転換ステップ の伎、細胞は、混合を続けながらルリアプロス (L8) 中で37℃で1 時間再生させ、続いて、 pSCPVUHM, p48LHLHもしくは p48LHHLに用 いる20μg/mlのクロラムフェニコール含有(CAM20) ルリア寒天上 にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしく はPSL301由来のその後の構築物に用いる 100μg/mLアンピシリン (AMP100)ルリア寒天プレート (LB-AMP100) 上にプレートした。

## 大陽菌クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、 Pronege社(米国、ウィスコンシン州。マデ ィソン所在)の Wagicミニープレッププラスミド製造キットを用い て、海太圧 (selection pressure) を維持するため適切な薬剤を含 有するLBプロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱 い説明書にしたがって使用した。

## プラスミドの構築

p49LHLHおよび p49LHHLと命名された2種のプラスミドを、多価 の一本城坑体を製造するために構築した。 p49LHLHを含有する宿主 細胞は、Vi-l-Vi-l-Vi-l-Vi で表すことができるポリペプチドを変 生した。ここでV。とV。はCC48抗体の経験と重鎖の可変領域であ り、およびリンカー(L)は、下記 SEQ 1D NO:5の配列を有する 25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

 $0.49 \text{LHIL を含有する存主細胞は、} V_L - L - V_R - L - V_R - L - V_L$  で表すことができるポリペプチドを変生した。こゝで $V_L$  と $V_R$  はCC49 抗体の経験と重額の可変領域であり、およびL は上記アミノ殷配列を有するペプチドリンカーである。

CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>u</sub>-L-V<sub>v</sub>-L-V<sub>v</sub>(p49LHLH)のヌクレオチド配列(SEQ 1D ND: 8) とアミノ酸配列(SEQ 1D NO: T) を図6に示す。CC49V<sub>L</sub>-L-V<sub>u</sub>-L-V<sub>u</sub>-L-V<sub>v</sub>-L-V<sub>v</sub>(p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ 1D NO: B) およびアミノ酸配列(SEQ 1D NO: B) を図7に示す。

## pSL301HTの構築

PSL801HTの構築を図8に示す。パシラス・リヘニフォルミス(Bacillus 11cheniformis)のペニシリナーゼP (penP) ターミネーターの配列を、Nhe I およびBanh I で45分間消化することによって、pSCPV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後 4.5%ポリアクリルアミドゲルから切取り、電気容出させ、エタメールで沈鍛させ、次に、同様に製造されたペクター:pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエブ所在の「nv11rogen社)中の同じ部位に連結した。 pSCPV UHMの製造手限は、1982年8月21日付け出駅の米国特許顕第07/835、885 号に記載されている。なおこの出駅の開示事項は本限に提用するものである。一般に、pSCPV UHMは、penPプロモーターのタクレオチド配列:固有Nco I 制限部位:CC48V、假域:Hind II 制限部位:25個のアミノ酸のリンカー:固有 Xho I 制限部位:CC49V、假域:Hind II 制限部位:CC49V、假域:Hind II 制限部位:CC49V、例本:Hind II 制限部位:CC48V、原域:Nhe I 制限部位:penPターミネーター:およびBanh I 制限部位を含有している(図8 参照)。このpenPプロモーターとpenPターミネーターは、Mezasら、J.8101、Chem.。258巻、

SCP5:5′-TAM <u>CCT ACC</u> ACCA <u>ACC CCT</u> TAG TGA CGA CAC CCT CAC TGA CCT-3′ 下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制度部位を示す。

増幅された VaDNAを、4 Mの PAG、電気容出、エタノールによる 沈殿および20 μ L 水への溶解によって精製した。その Va 配列を Xho I と Nhe I の制限酵素で消化し、同じ制度酵素で消化され続い で精製された pSL301Tベクターに対するインサートとして用いた。 標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4 μ L)を用いて コンピテント大腸菌AG I 細胞を形質転換させた。形質転換された細 胞を、 LB AMP100寒天ブレート上にブレートした。 CC49Va インサートを含有していることを示す候補的クローンを Nhe I およびXho I 消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB) 社(米国、オハイオ州クリープランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ペクター中、 Xho I 部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)と CC48VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、 CC49Vm の配列を確認し、pSL301HT中に正しい CC48Vm 配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301ーHHLTおよびpSL301ーHLHTの同者を積築するときの出発点で使用した。使用した配列決定用のオリゴをこゝに示す。

pSL3015EQB(SEQ 1D ND: 12) および CC49Vm (SEQ (D NO: 13) のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQ8: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'
CC49YHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

## 実施例 [ p48LHHLの借鉴

PSL301HT (5 μg) を出発物質として用い、これを Eco4TⅢおよび Nhe I で情化し、大きい方のベクターフラグメントを精軽した。 CC49Va 挿入フラグメントは、5 \*\* オリゴとして SCPGCを用いかつ

11211~11218 頁、1983年に記載されている。

上配のリゲーション反応物の一部(3μL)を、LB-AMP100寒天 ブレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌 AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミネーター、インサ ートを含有するポテンシャルクローンを、 Pharmacia社 (米国, メ リーランド州、ガイサーズバーグ所在)の T7 Quickprime \*\*P DNA 保険キットと、Buluwelsら、 Nucleic Acid Research, 17巻、 452 質、1989年に記載されているマイクロ旅によるコロニー溶解法をと もに用いてスクリーニングした。プロープは、penP-NheI-BamHI ターミネーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによ って提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、 かつBamHIおよび Nhe Iによる消化物由来の 207個の塩基対挿入断 片 (図 6 に示す1858~2185の塩基対 (bp))を含有するクローンを pSL3017 と命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有 するpSL301HTを構築するのに遺択した。 Whe I ~ BanH I penPターミ ネーターをpSL801中に配置した理由は、その Nhe I とBack I の部位 の間のポリリンカー領域中に存在する Eco47皿制限エンドヌクレア ーゼ部位を除くためであった。このことは、 Bco4T正部位が、構造 体中に各連続V領域を配置するのにユニークである必要があるV。 とVnの領域を続いて構築するため設計された。各V領域がEco47型 - Nhe I 部位に付加されると、 Eco47皿は各場合に破壊されて、ユ ニーク挿入断片に入ってくる次の Eco47皿部位を形成した。

V. 配列は、PCR増幅の標的として pSCPV UHWを用い、オリゴの5 'SCP1と3' オリゴSCP5によって PCRで作製した。SCP1に対するDNA 配列(SEQ ID NO:10) とSCP5に対する DNA配列(SEQ ID NO:11) は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAMA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

3′オリゴとしてSCP5を用い、 PCRによって製造した。 SCP68のヌクレオチド配列(SEQ ID ND:14) は下紀のとおりである。

SCP6B: 5' -TAMA <u>TOC CCA</u> CAT CAC CCA ANG AMA CAC CCA CCT AMA AMA CAC CAT

CCC AMA AMG CAT CAC CCC AMG AMA CAT CTT CAG CTT CAG TTTG CAG CAG

TCT+G'

またオリゴ SCPGBはリンカーのコーディング領域の一部(SBQ ID ND:14のbp8~78) を含有している。 pSCPV UHM中のCC48VH側的でアニールするよう設計された数オリゴの部分は、 SEQ ID NO:14中のbp77~80由来のものである。

下録をつけた配列は Psp I 部位に相当する。得られた PCRインサートを精製し、、Fsp I と Nhe I で 商化し次いで pSL301HT Eco47 皿 Nhe I ベクターとのリゲーション反応に用いた(図 7)。 コンピテント大場 歯 AG I 細胞を、このリゲーション反応物( $8~\mu$ L) で形質 転換を行うのに用い、L8 - AMP 100 寒天 ブレート上にプレートした。 pSL301HHT 生成物を示す正しい大きさの Xho I - Nhe I - 100 不可する 100 個のクローンの配列をオリゴ 100 SQP 100 不可する 100 不可求 10

SQP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-8'

最終のリンカーV。サブユニット(bp1544~1963、図T)は、5′オリゴの SCP7bと3′オリゴの SCP8mを用いかつ PCRの標的としてpSCPV UHMを用いて製造した。 SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ 1D ND:17) は下記のとおりである。

SOP75 : 5' -TAM  $\underline{\text{TOC}}$  CAT GAC CCA AND AM GAC CCA CCT AM AM GAC CAT GCC AM ANG CAT GAC GCC AMB AMA CAT CTT CAC ATT GTG ATC TCA CAG TCT CT.

下線をつけたヌクレオチドは Psp I 部位である。 SCP8aのヌクレオチド配列(S8Q ID ND:18) は下配のとおりである。

SCP98: 5' -TAAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC CAG CTT GGT CCC-8'

下線をつけた最初の一組は Nhe I 部位に相当し、もう一つの組は Af1 II 部位に相当する。 SCPTDの アクレオチド 8 ~75 はリンカーをコードし (図 7 の ヌクレオチド 1544~1612)、一方 V。にアニールするヌクレオチド 77~89 は図 7 の 1813~1635 に相当する。 ブライマー SCP 98 は、その 5 、末端の短かいテール、 Nhe I 制限部位、終止コドン、 Af1 II 制限部位および V。の最後の 21 個の塩基を含有している。 PSp I と Nhe I による消化の後、この得られた 420 bpのインサートを精設して常製 pSL30 RHTベクターの Nhe I と Eco 47 直の部位に連結し、候補的なクローンを Nhe I と Xho I でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ48 LFR2(一)と SQP I で配列が検定されて、 pSL30 I RHLT中に新たに挿入された配所が確認された。そのヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:18) は下記のとおりである。49 LFR2(一): 5′-CTG CTG CTA CCA CGC CAA G-3′

プラスミドpSL301HBLTを Xho I および Nhe I で摘化し、精製し、得られた1179bp V a ーリンカー・V a ーリンカー・V b セグメントを pSCPV UHMに連結して p49LHBLを製造した。なおこの pSCPV UHM は同じ制度酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物(4  $\mu$  1 部分)を用いてコンピテント大騎園AG 1 細胞(Stratagene社)を形質転換し、LBCAM2の 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、 p49LHHLを含有させるために選択した。 p49LHHLは、CC49多価一本鎖抗体 sCPV2: $V_{k}$ -L- $V_{k}$ -L-

と欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド 1533~1537に相当する5個の塩基の欠失がみとめられ、そしてTであるべきはずのヌクレオチド1531は DNA配列のデータから確認した ところ実際にはGであった。後られた配列は、

5' …GAAGCGCTT…であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Bco47耳部位を形成した。図 9 の AGCGCTの配列はヌクレオチド1530, 1531, 1532, 1538, 1539および1540に相当する。この誤まりは次のステップで移正され、オリゴ SCP8C の末端に 5 塩基の欠失を組込むことにによってpSL301HLHTを製造した。

SCPGC: 5' -TAAGGGCTGATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA
GGACGACGCAAAAAAGATGATGCAAAAAAAGGATCTGG'
AGGTTCAGTTGCAGCAGCAGTCTGAC-3'

SCP6C中の下線をつけた配列は Eco47頂部位に相当する。 PCRにおいて、 SCP6Cは 5 ' オリゴとして用いられ一方 SCP10は 3 ' オリゴとして用いられて、リンカー CC49V。セグメントが生成する。
SCP10 のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 23) は下配のとおりである。
SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA

CTG AGG TT-3

SCP10中の下線をつけた配列は図8のヌクレオチド1959~1993に見られる Nhe I 部位に相当する。この場合、 PCRインサートはNhe I だけで預化され次いで精製される。ベクター(pSL301HLT) はBco47軍部位(先に形成されている)および Nhe I 部位で預化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(3 μL)を使ってコンピテント イー・コリAG I 細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB – AMP100プレート上にプレートし次いで機補的クローンを Xho I と Nhe I でスクリーニングした。正しい大きさ

ド配列を含有している。

実施例2: p49LHLHの構築

p49LHLHの構築を図11に図式的に示す。リンカーV、のサブユニットを 5 ' オリゴの SCP7bと 3 ' オリゴの SCP9で製造した。

SCP9 : 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GCG CTT AGT TTC

AGC ACC AGC TTG GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド 8 ~76)は図 8 のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124~1192に相当する)および図 8 のV、のヌクレオチド1193~1215に相当する、 PCRに対する pSCPV UHM係的(ヌクレオチド77~99)にアニールした。

SCP9は、Nhe I 部位(第一の下線をつけたヌクレオチド)と Eco47 正部位(第二の下線を付けたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次の V 模域を受けるための pSL801 HLTを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18~23 は図 9 のヌクレオチド 1532~1537(リンカーの最初の 2 個のアミノ酸をコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド24~49 は、 PCRにおける SCP9のアニーリング領域である 図 9 に示すヌクレオチド1508~1531 に相当する。ブラスミド pSL301 HTを Eco47 正と Nhe I で前化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め Psp I と Nhe I で処理され精製された、 PCRからのリンカーーCC49 V。 DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3  $\mu$  L)を用いて大腸面AG 1 コンを連結させる。その連結混合物(3  $\mu$  L)を用いて大腸面AG 1 コンラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PBNPTSEQ2を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ 1D ND: 21) は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HTクローン中に PCRの賞まり

の DNAを有する 3 個のクローンを掛た。これらのクローンのうちの 2 個は、オリゴ40 VLC DR3 (+) および SQP1を用いて配列を決定した。そのメクレオチド配列(49 VLC DR3 (+) の DWQ 1D ND: 24)は下配のとおりである。

48VLCOR8 (+) : 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図 8 のヌク レオチド1533~1993からの配列が確認され、正しいpSL301HLHLクローンを示した。

大腸窗中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、pSL301HLHT(5  $\mu$  g)を Nhe I と Xho I で 育化し、次いで  $V_*$  –  $I_ V_*$  ー  $I_ V_*$  ー  $I_ V_*$  一  $I_ V_*$  —  $I_-$  —  $I_ V_*$  —  $I_-$  —

実施例 3 CC48 scFv2のLHLHとLHHLが共有結合した二量体の特製

CC49の共有結合した一本領二量体(acPv2) の精製を行うために、大場面のベリプラズマ細胞質の団分を、 p49LHLHと p49LHHLの両者の 1.DLの一夜培養物から顕製した。要約すると、培養物を 25DmL づつの 4 部分に分割し、Sorvall GS-3 ロータで10分間 500Drpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、 30mM NaClを含有する10mMトリスーHC1 pH 7.3からなる 10DmL中に再配倒させた。細胞を再びペレット化し、合計 100mLの30mMトリスーHC1 pH 3 で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v %

のスクロースを含有する30mlトリスーHC1 pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、跨々協造しながら、宝温に10分間保持した。高級性細胞(hypertonic ceil)を前配のようにしてベレット化した。次のステップでショックを与えて、酸ペレットを20mLの氷冷 0.5ml MgCI 中に速やかに懸濁させ、次いで時々協造しながら氷上に10分間保持した。その細胞を育配のようにしてベレット化し、大膳館の周辺細胞質の固分を含有する上股み減を、0.2μmの Naige社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の濾過装置で濾過することによってさらに積湿にし、次いてAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentrippp 30およびCentricon 30で 1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHHLのクローン由来の最縮周辺細胞質のショケート (shockate) を、 Pharmacis社 (米国,ニュージャージー州,ピスカタウエイ所在) の Superdex 75 HR (0/30 HPLC カラム (予め P8Sで平衡化させたもの) に注入した。競合 BLISA法で測定する場合、問題の生成物は 0.5mi/分の流量で21~24分間放出させた。活性圏分をブールし、先に述べたようにして最短し、次に、システム500 Mjcrodialyzer Unit(Piercs Chemical社) を用い、緩衝被を3~4回変えがら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリスーHC1 pH 7.8に対して一夜遭折を行った。その試料を Pharmacis社のMono Q HR 5/5アニオン交換HPLCカラムに往射した。緩衝液Aとして20mMトリスーHC1 pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス~HC1 pH 7.6を用いる勾配プログラムを、 1.5mi/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合 BLISA法で測定する場合、を43~4分間カラムから放出させた。この時点の圏分の、二つのSDS~PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアン

ブリン B、 ウシカルポニックアンヒドラーゼ、ヒトカルポニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、 3種のヒラマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、p1値はそれぞれ4.85, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 9.00, 8.20 および 8.8であった。ゲルは FMCの指示にしたかって染色し脱色した。DNASTAR プログラムによって両方の scPv2の種のp1値として 8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なパンドがゲル上に、両者のp1値の 8.9の位置にみとめられた。

IeG. scPv2 (LHLNおよびLHHL) のような特製CC49沈体は、 280nm 披長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光保監値Ex は各々、先に引用した Wetlewfcrの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、 CC481gG, CC49scFv2LHLH, CC49 scFv2LHHLおよびCC49acPvのE・1\* (280nm)値はそれぞれ 1.49, 1.85, 1.65および1.71であった。

## 実施例4

CC49scPv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、 IgGおよびCOOH末端 にPLAGペプチドを有する単量体scPv型と比較した。

パーセント競合(percent competition) を下記式によって ELISA のデータから求めた。

ゼロ競合 - 試料税取り値 (OD 405 - 450nm) ゼロ競合 - 100% 組合 × (00

\*ゼロ競合(zero competition)\*値は、1 % BSAをビオチニル化CC49(3×10~14モル)と1:1比率で混合して測定し、一方 100%競合値はビオチニル化 CC491gGと混合した CC491gGの5μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図1に示す。試料の吸光度値は 405nm~ 450nmで測定した。3回の映取り値の平均値を使

Mono Qカラムを活性Mono S面分について再度使用したが使用した 緩衝液は20mMトリス-IRCI pH 8.0であり、焼量は 0.8mL/分に低下 させた。生成物はカラムとの結合なして放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定の ために貯蔵した。

## 等電点電気採動

構築物の等電点 (pl) は DNASTAR社 (米国, ウィスコンシン州, マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-titrateを使用して予測した。アミノ酸組成、Warst Copi 値に基づいて計算した。

試験では、plは、 PMC Bioproducts社(米国、メーン州、ロックランド所在)のIsogel IEFプレートpH範囲 3~10を使用して創定した。上記 IEFを操作するために、Biorad社(米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在)の電気放動袋量を、上記阿メーカーの指示にしたがって使用した。その電気放動の条件は、20 $\alpha$ Aで 500V(限定)および一定電力の10Wであった。等電点電気放動は90分間で完了した。Biorad社の IEF標準品は、フィコシアニン、 $\beta$ ラクトグロ

用した。最初に試料( $25\mu$ L)を、 TAG-72でコートしたマイクロリットルブレートに、  $(.0\times (0.10)$  モルの結合部位/配したで活力に、 EX + F + L 化CC48( $4 \mu$  g  $I \mu$  1 1 + 20,000に希釈、 $25 \mu$  1 使用)で試料を  $(I \times 2)$  を行った。 画方の形態の scFv2は 1gGにほ Y 等しい(図11参照)。 別の試験で、CC48scF V 単量体を Fab フラグメントと比較した。 両者は一価であるが、 これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。 これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。 これは、単量体の種に比べて全 I gGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、 scFv2分子が、その CC491gGの観と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存の [gG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫治療法において腫瘍: 組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施思様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当款技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施側は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

CONTRACTOR AND AND A CONTRACTOR

FIGURE 1

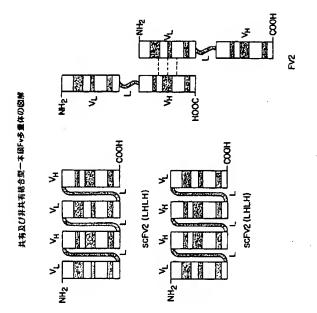


FIG. 2

FIG. 3

Asp Ile Vel Het Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Vel Ser Val Gly Glu Lye Vel Thr Leu Ser Cye Lye Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lye Asn Tyr Leu Ale Trp Tyr Gln Gln Lye Pro Gly Gln Ser Pro Lye Leu Leu Ile Tyr Trp Ale Ser Ale Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Vel Lye Thr Glu Asp Leu Ala Vel Tyr Tyr Cye Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lye Leu Val Leu Lye

F1G. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT
GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
CAG GGG CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC
GTC TCC TCA

参書(内容に変更なし) FIGURE\_6

CC49 N-1-VH-1-VL-1-VHOONA及Uアミノ酸配列

## FIG. 5

Glu Val Gle Leu Gin Gin Ser Aep Ale Glu Leu Vel Lye Pro Gly Ale Ser Vel Lye Ile Ser Cye Lye Ale Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Aep Ble Ale Ile Hie Trp Vel Lye Gin Aen Pro Glu Gin Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Aen Aep Aep Phe Lye Tyr Aen Glu Arg Phe Lye Gly Lye Ale Thr Leu Thr Ale Aep Lye Ser Ser Ser Thr Ale Tyr Vel Gin Leu Aen Ser Leu Thr Ser Glu Aep Ser Ala Vel Tyr Phe Cye Thr Arg Ser Leu Aen Het Ala Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Ser Vel Thr Vel Ser Ser

82 382 2 . 2 ដ្ឋ ₹ E £ 4 35 3£ £g TAC 3 **38** 66 35 Şĕ GAC E ŭ TAC 85 85 32 53 Ser TY. TCA ដូ 4 8 **44 88** 25 32 A P P Z Ž E CG 7 88 非 AL GOT A TC 845 AAC 104 ¥C. Ę 223 T T T 400 38 ZE 53 ¥. 7 ដុង្គ ATA 45 ä Lys CAT COA TAC ATA TAT 5 3 35 KK 48 55 700 PEDERAL-엻 PEG 25 48 55 Š TAT ¥ AGT 1 # 2 32 11 35 ü Ē 55 E 5 5 5 ž48 35 Ser Ş g ¥ 5 ş ţ 12 23 35 36 Ë ñ E 25 641 CT 0 54 55 £5 73 110 ş ATT C61 CAT 256 48 35 550 CAT **C**11 EE AAG Ë # tj 5 25 Se A Ė ន្ទ 161 5 5 Ę 38 F 5 75

		25 57 27 57	· N		æ	,	•					3	表平	7-50	3622	(12)
							<b>40</b>			814	862	910		928	9001	1054
FIG 6B		60 Are Clu Sar Gly Val Pro Asp Are Phs thr Gly Sar AGG GAA TCT GGG GTC CCT GAI CGC TTC ACA GGG AGG	Lys Thr Glu AAO ACT GAA	90 Leu Ala Fal Tyr Tyr Cys Glo Glo Tyr Tyr Ser Tyr-Pro Leu Thr Phe CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGG TAT CGC CTC AGG TTC	110 Hind III G1y Als Oly The Lys Leu VAl Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys GCI GCI GCG AGG GTG GTG GTG AGG CTT AGT GCG GAC GAT GGG AAG	Asp Asp Ala Lys		29 <u>21</u>	M HA THE	Asp Lsu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Olu Leu Val Lys Pro GaC TTG GaG GTI CAG TTG CAG CAG TCT GAG GCT GAG TTG GTG AAA CCT	160 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr GGG GCT TCA GTO AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT	170 Asp His Ala lle His Trp Val Lys Cin Asp Pro Giu Gin Cly Lau Giu Gac cat Gca att Cac tGG GTG Ala Cag Aac CCT Gal Cag GGC CTG GA	190 CC49FHP- GAT BAT TAT AAA TAC AAT	Trp lis Gly Tyr Phs Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phs Lys Tyr Asn Glu TGG ATT GGA IAT TTT TCT GGC GGA AAT GAT GAT TAT AAA TAG AAT GAG	Lys alm The Leu The Ala Asp Lys Ser Ang GCC ACA CTG ACT GCA GAC ANA TCC	Ala Tyr Wal Gio Lou Asn Ser Lou Thr Ser Giu Asp Ser Ala Wal fyr GCC TAC GTG CAC CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT
	1102	1150	1198	1246	1294	1342			1390	}	1438	1486	1534	1582	1630	1678
FIG. 6D	240 Phs Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Alm Fyr Tro 01y Gin Gly Thr Ser TIC TGT ACA AGA TGC GTG AAI ATG GGC :IAC TGG GGT CAA GGA AGC TGA	250 Val Thr Val Ser Sør Leu Sør Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala GTG ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCT	270 Lys Lys Asp Asp Alm Lys Lys Asp Asp Als Lys Lys Asp Lsu Asp Ils Aaa aaa gaf GCC aaa aao Oaf gac GCC aag aaa gaf Cff gac aff	Sar Pro Ser Ser Lau Pro Wal Ser Wal TCT CCA TCG TCC CTA CCT DTG TCA GTX	Val Thr Lew Sor Cys Lys Ssr Ssr Gln Ssr Lew Law Tyr Ser Gly Aen GIT ACT TIG AGC IGC AAG ICC AGI CAG AGC CTT TIA IAI AGT GGI AAI	320 Caa aag aag tyf Leu als Tfy Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Caa aag aag tag Ttg GCC Tgg Tag Cag GA aaa GCa GGG Cag TCT CCT		F1G. 6E	330 Lys Lew Lew Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp AAA CTG CTG ATT TAG TGG GCA TGG GCA TGG GAA TCT GGG GTG CGT OAT	Phe Thr Leu Sar 11e	370  370  390  390  300  300  300  300	Val Lys The Olu Asp Leu Als Val Tyr Tyr Cys Gin GIG AAG ACT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG Tat 380	Sar fyr Pro Leu Thr Phe dly Ala Gly Thr Lys Lau Val Lau Lys Leu Acc Tat GCC CTC Acd TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG AAO CTA	Ecoly III Ser als Asp Asp Ass Lys Lys Ass als Ass Lys Asp Asp Ass Lys Acc Get Gat Gat Get Ang Ang Occ Gen Ash Ang Gan Gat Gat Ash	VH Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser OAG GTT CAC TTG CAG CAG TCT	430 Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala GCI GAG TIG GTG AAA CCI GGG GCI TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCI

## 静豊(内容に変更なし)

FIGURE 7

*
20
5
Ä
ž
NA.
ĕ
۶
₹
7
¥
ĭ
5
Š

1726

ASO Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Alm Ile His Trp Wal Lys Glm Asn ICT GGC IAC ACC TIC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC

F1G. 6F

1774

1822

1870

9	6	142	180	238	286	334	382	9
70	¥	ATT	¥#	AGA	55 55	is Ta	25	Ly a
ខ្ល	S.	TAC	3	33	85	3£	Se TCT	. 25
E	100	CAC	IAC	55	100 T	35	CAG	AGC
Ž	53	₹	ACC	E T	88	200	1C.4	32
700	E	110	5	99	狂	Set	ATG	845
	2	Ş	CAT	45	53	A14 600	140	36
TTG ACA GCT TAT CAT CGA TGA ATT	TCA	AAT	¥	¥ÇŢ	ATAT	414	åE	273
-5	AGG	IAI	55			400	ALP GAC	980 800
25	ACG	ATA	99	PERPRI- AAC	ATC AAT CAA PENPB2-		4 55 50 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10 10	Gly Glu
TAT	S.	IAC	AGT		ATC	35	Met I	E E
GCT	22	ţ	ž.	ŢĊ	YCC	Tyr Leu Leu Pro TAC CTA TTG CCT	Meo I Ala Met GCC ATG	Ser Val
ACA	8	¥	161	161	Ę	77	83	Val GTG
	12	E	104	GAT	g	LYS	45	25
101	1	ð	¥	ğ	CAT	-22 Met ATG	<b>₹</b> 8	35
TC# 16T	Ę	CT1	VY	E	£	110	SQ.	5 % T
ې ئ	ţ	YCC	101	Ę	515	£.	35	707

## F1G. 7B

10 Ser lev Lev Lyr Ser Gly Asn Gla Lys Asn Tyr Lev Ala  10 AGC CTT TTA AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TGG GGC  10 Gla Lys Pro Gly Gla Ser Pro Lys Lev Lev Ils Tyr Trp  10 Cad AAA CCA GGC CAG TGT GGT AAT TGG GTT ATT TAC TGG  10 AAA CCA GGC CAG TGT GGT AAA CTG GTG ATT TAC TGG  10 AAA CCA GGC CAG TGT GGT AAA CTG GTG ATT TAC TGG  11 AGG GAA TGT GGG GTC CCT OAT CGG TTC ACA GGC AGT GGA  12 AGG GAA TGT GGG GTC CCT OAT CGG TTC ACA GGC AGT GAA  13 AAA TTC AGT CTG CATC AGG AGT GTG AAG ACG CAA GAC  14 Tyr Tyr Cys Gla Gla Tyr Tyr Ser Tyr Pro Lau Thr Phe  15 TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGG TAT CCC CTC ACG TTC  16 AGG GTG CTG AAG TAT TAT AGG TAT CGC GAC GAT GGG  17 TAT TAC TGT CTG CTG TAT TAT AGG TAT CGC GAT GGG AAA  18 AAA Lys Lev Wal Lev Lys Lev Ser Aia App Aap Ala Lys  19 AAA Lys Lev Wal Lys Lev Lys Lev Ser Aa Aag Aap Ala Lys  10 CGC AAG AAG CTG CTG CTG AAG CTT AAA AAG TGG AAA  10 CGC AAG AAG CTG CTG TAT CAG AAG AAG GAT GGT AAA AAG  11 GCC TAC TTG TAT ATTAC CTT AAG AAA GAC GAT GGT AAA AAG  11 GCC TTG TTG TATAC CTT AAG AAA GAC GAT GGT AAA AAG  10 CCC TTG TTG TATAC CTT ATTACA CAT TGC AAA AAG TGG TAAA AAG TGG TTG TTG TTG TT							
Sar Leu 130  A GC CTT TIX TAT AGT GGT AAT CAA AGG AAC TAC TTG  B AGC CTT TIX TAT AGT GGT AAT CAA AGG AAC TAC TTG  CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG TT TAC  60  A AR GLU Ser GLY WA! Pro Asp Arg Phe Thr GLY Ser  A AB Phe Thr Leu Ser Ila Ser Ser Wa! Lys Thr Olu  A AP Phe Thr CAG CAG CTC CTC AGG AGT GGG AGT  CAT TIC ACT CTC CCC ATC AGG AGT GTG AAG ACT GAA  TYR TYR CYS GLB CLN TYT TYR Ser Tyr CCC CTC AGA  TYR TYR CYS GLB CLN TYT TAT AGG TAT CCC CTC AGA  TYR TAR TAG TGT CAG CAG TAT TAT AGG TAT CCC CTC AGG  TAR Lys Lys GLB CTG AGG CTT AGT GGG GAT GGG  AAL Lys Lys Asp Asp Als Lys Lys Asp Als Lys Lys Agg Als Lys Lys Agg AAG AGG CAT AAA AGG CAT AAA AGG CAT CAG AGG CAT GCC AGG AAG AAG GAT GAC GGT AAA AGG CAT AAA AGG CAT AAA AGG CAT CAGG AAG AAG GAT GAC CAT AAA AGG CAT CAGA AAA AAAA A	478	526	574	622	670	718	166
Ser Leu Leu Tyr Ser Giy Aan Gia Lya Aan Tyr 6 AGC CTT ITA IAT AGT GGT AAT CAA AAG AAG TAG TAG 5 GA AA CCA GGG CAG TGT GCT AAA CTG CTG AII 6 GA AA CCA GGG CAG TGT GCT AAA CTG CTG AII 6 AB Phe Tyr Leu Ser Iat Ser Ser Val Lya Thr 6 GAI TIC AGT CTG TGC AGT CGG TAG AGG AGG 70 71 72 73 74 75 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 76 77 77	5 4 5 5 4 5	£5	61.y 66.k	Alp	ag T	120 Lys AAA	Lys
Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn a AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu a Ga AAa CCA GGG CAG TGT GCT AAA TGT GTG  60 AB Phe Tor GGG GTG CCT OAT CGG TTC AAA AGG GAA TCT GGG GTG CCT OAT CGG TTC AAA AGG GAA TCT GGG GTG CCT OAT CGG TTC AAA AGG GAA TCT GGG GTG CCT OAT CGG TTC AAA AGG GTA TCT CT TCC ATC AGG AGT GTG AAG TAT TAC TGT CAG GAG TAT TAT AGC TTT CCC The Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp ACC AAG CTG GTG CTG AAG CTT AGT GGG GAC ACC AAG GTG GTG CTG AAG CTT AGT GGG GAC ACC AAG GTG GTG CTG AAG CTT AGT GGG GAC ACC AAG GTG GTG CTG AAG CTT AGT GGG GAC ACC AAG CTG GTG CTG AAG CTT AGT GGG GAC ACC AAG GTG GTG CTG AAG CTT AGT GGG GAC ACC AAG CTG GTG CTG AAG CTT AGT AAB ASP AGGC CAT AAG AAA AAA AAC CAT GCG TAC TTC TTA TANTAL-SEG	32	72	Ser	Olu GAA	100	48	53
Sar Lev Lev Tyr Sar Gly Asn Gln Lys 0 AGC CTT TIX TAI AGT GGT AAT CAA AGG 1 GAG AAA CCA GGG CAG TGT GCT AAA CTB 1 GAB AAB CCA GGG CAG TGT GCT AAA CTB 60 1 AAB GAA CCA GGG GAG CCT OAT CGG TTC 1 AAB Phe Tbr Lew Sar Is Sar Sar Wal 1 GAT TTC ACT CTC CCT AGG AGT GTG 1 TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT 1 TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT 1 TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT 1 TAT TAC TGT CTG CTG CTG AGG CTG CAG 1 TAT TAC TGT CTG CTG CTG AGG CTG CAG 1 TAT TAC AGG GTG CTG CTG AGG CTG CAG 1 TAT TAC TGT CTG CTG CTG AGG CTG CGG 1 AGG CTG GTG CTG AGG CTT AGG CTG CGG 1 AGG CTG CTG CTG CTG AGG CTG AGG AAG AAG AAG CTG TAT ATA AGG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG C	TY TX	##	598	Ę.	125	CAT	45
Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Aan Gln Lya 6 AGC CTT ITA IAT AGT GGT AAT CLA AAG 6 GL AAA CCA GGG CAG TGT GCT AAA CT6 6 6 6 AAB CCA GGG CAG TGT GCT AAA CT6 6 AB CA TCT GGG GTG CCT OAT CGG TTC 6 AB Phe Tbr Leu Ser IA Ser Ser Val 6 AT ITC ACT CTC TCC ATC AGC ACT GTG Tyr Tyr Cys Gla Gln Tyr Tyr Ser Tyr 6 Tyr Tyr Cys Gla Gln Tyr Tyr Ser Tyr 6 Thr Lys Lys Lau Lys Leu Ser AAa ACC AAG CTG GTG CTG AAG TAT 6 GGG AAG AAG GTT GAC GCT AAG CTA 6 GGG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AA 6 GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AAA 6 GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AAA 6 GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AAA 6 GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AAA 6 GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AAA 6 GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AAA 6 GCG AAG AAG GAT GAC GCT AAG AAA AAA 6 CCC TTC TTC CTA TRAVEL-15EQ	Asa	CTG	ACA T	173 173	£g		
Ser Leu Lau Tyr Ser Gly Asn Gln  6 AGC CTT ITA ITA AGT GGT AAT CAA  6 Ca AAA CCA GGC CAG TYC CCT AGT  6 AA CCA GGC CAG TYC CCT AGT  6 AB Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg  7 AGG GAA TYC GGG GTC CCT OAT CGG  6 AB Phe Thr Leu Ser Ila Ser Ser  6 AT ITC ACT CTC CC ATC AGG AGT  TAT IAC TYC CTC CC ATC AGG AGT  TAT IAC TYC GGG GG TAT TYT AGG  Thr Lys Lau Val Leu Lys Leu Ser  ACC AAG CTG GTG CTG AGG CTT AGT  ALS Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys GGC AAG CTG CTG AGG CTT AGT  ALa Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Cyg GCC AAG CTG CTG CTG CTG CTG CTG AGG CTT AGT  ALa Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Cyg GCC AAG CTG CTG AGG CTT AGT  ALa Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Lys Cyg CCC AAG CTG CTG TAGG CTT AGT  ALC CTA TYC CTA TAGG CTC AGG CTT AGT  ALC CTA TYC CTA TAGG CTC AGG CTT AGT  ALC CTA TYC CTA TAGG CTC AGG CTT AGT  ALC CTA TYC CTA TAGG CTC AGG CTT AGT  ALC CTA TYC CTA TAGG CTC AGG AGG CTC AGG AGG CTC AGG CTC AGG AGG AGG AGG CTC AGG AGG AGG CTC AGG AGG AGG AGG AGG AGG AGG AGG AGG AG	LYS	100	TT C	120	0 TAT		
Age to the leve try Ser Gly Asn a Age cit first and Gly Ast and Glo Lys Pro Gly Glo Ser Pro Gly Rai Pro Asp Age Glo Ser Cit cct at Age Gal Var Cit Cct at Age Cat Ctt Cct at Age Cat Ctt Cct Cat Cat Cat Ctt Cct Cat Cat Cat Cat Cat Cat Cat Cat Cat Ca	33	LYS	ATE	Ser		\$5	
Sar Lev Lau Tyr Sar Gly 6 AGC CTI IIA IAI GGI 6 Gln Lya Pro Gly Gln Sar 6 GA AA CCA GGG CAG TUT 60 6 AAG GAA CT GGG CAG TUT 6 GA AT CT GGG CT CT 6 AG GAA TUT GGG CT CT 6 AT GAA TUT GG GT CT 7 TY TY CYS Gln Gln Tyr 7 TY TAC TUT CAG CAG TAT 7 TAT TAC TUT CAG CAG TAC 7 TAT TAC TAC TAC CTG TAG CAG 7 TAT TAC TAC TAC CTG TAG 7 TAT TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC CTA TAGACC 7 TAC	AAT	il il	ASP	Ser	55	ESE	
Sar leu Lau Tyr Sar 6 AGC CTT TTA AGT 6 Gln Lys Pro Gly Gln 6 GAA CCA GGG CAG 60 As GCA TCT GGG GTG A AGG GAA TCT GGG GTG 6AT TTC ATT CTC CCC Tyr Tyr Gys Gla Gln TAT TAC TCT CAG CAG Thr Lys Lys Gys GTG CTG Thr Lys Lys Asp Asp 6CC AAG AAG GAT CAC 6CC TTC TTC CTT GAG 6CC AAG AAG GAT CAC 6CC TTC TTC CTT CAT 6CC AAG AAG CAT CAC 6CC CTC TTC CTT THRY	55	101	i i	II.	44	12 P	4555
AGC CTI ITA ITA  AGC CTI ITA ITA  CAG AAA CCA GGG  60  60  ABP Pha Phr Lau  CAT ITC ACT CGG  ABP Pha Phr Lau  CAT ITC ACT CTC  Tyr Tyr Cys Gla  Tyr Tyr Cys Gla  Tyr Tyr Cys Gla  Tyr Lys Cys Gla  Thr Lys Lys Cys GGG  Thr Lys Lys Lys Asp  GCC AAG AAG GAT  CGC TTC CTC CTC  GGG AAG GAT  CGC TTC CTC CTC  CGC TTC CTC CTC  CGC CTC CTC  CTC CTC  CTC	Ser	GLO		8 50 101	550	38	CAC CAC
Ser leu Leu Banda de CTT TTA de CTT TTA de CAA CCA AAA CCA AAA CCA AAA CCA AAA CCA AAA CAA TTA CAT TAT T	77.	01. 000	55	35	619 619 619	35	
Ale Lys Acc Acc CTI Acc Acc CTI Acc	HE R	S S	Ser	ξţ	101	238	
A ACC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC C	št	Ly3 AAA	Glv GAA	110			
00 65 dt	Ser	CAG	A 55 A	Aap	TAT	40	
60 60 48 48 68 468 468 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60 60	615	CAG	Ala Ser	ACA ACA	1 to	55	458
Ser TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC TAC GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG G	Ser	TAC	Ser	500	844	SQ.	
100 TO	707	100 100	A1.	Ser	32	661	

# 460 Pro Glu Gin Gly Leu Glu Trp Ile Oly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp CCT GAA GAG GGC CIG GAA TGG ATT GGA TAT ITT TCT CCC GGA AAT GAT Thr Alm Tyr Wal Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser ACT GCC IAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT 480 Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Als Thr Leu Thr Ala Gai III aaa Iac aat Gad agu Itc aag Ggc aag Ggc aga CTO Agt GGA

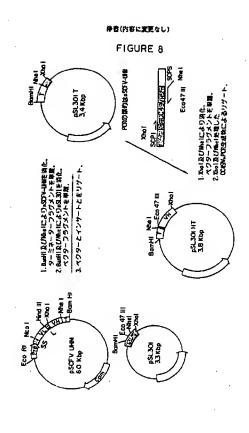
Ser Ser TCC AGC

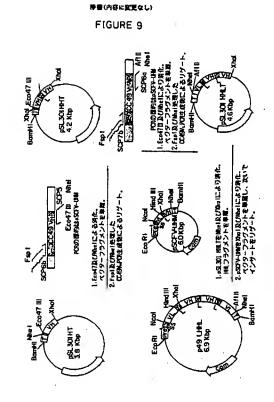
1918 1966 Thr Arg Ser Leu Ash Met Ale Tyr Ace ade TCC CTO ART ATG GCC TAC 530
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser \*\*\* Rhs I
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCA TAA AAA GCT AGC GAT 510 Tyr Phe Cys 1 TAT ITC 1GT A Ser Ale Val TOT GCA GTG Asp CAT GAG

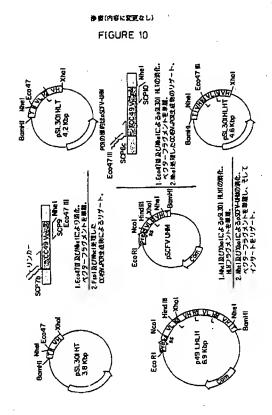
## F1G. 6G

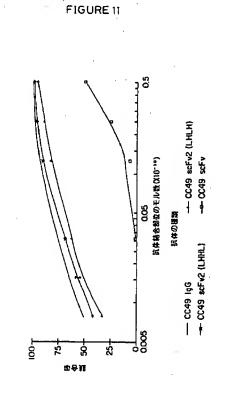
2002 2110 2014 2158 2165 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TGT TAC ATA AAG TCA GTT GGT GAT CAA GCT SQP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT PENPTSEQ2- 0 TAT TTC AGT GAA CCA GTA GTT AAA GAT CAT GTO AAG AAA AAC GGO AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC GGG TIT TTG TCG AAA TCA TAG GGG AAT GGG TTG GAT TGT GAC AAA ATT CAT ATC ATT GTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT Bamit I CGC ATC C-3\*

F16. 7E		F1G. 7C	
380 Ser Leu Aan Het Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Wal Thr Wal Ser TCC CTG AAT ATG GCC FAC TGG GGI CAA GGA ACC FCA GTC ACC GTC TCC	1534	Xho II 140 Asp Leu Gly Vel Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Vel Lys Pro GAC CTC CAC GTT CAG TG CAG TGT GAC GCT CAC TTC GTG AAA CCT 81!	81 <b>x</b>
400 Ser Alm Asp Amp Alm Lys Lys Asp Alm AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAM CAC CCA	1582	160 Cly Ale Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ale Ser Cly Tyr Thr Phe Thr GGG GCT TCA GTC AAC ATT TCC TCC AAG CCT TCT GGC TAC ACC TIC ACT 86	\$62
410 Ale Lys Lys Asp Asp Ale Lys Lys Asp Leu Asp Ile Vel Met Ser Oln GCC Aaa Aag gat gac GCC aag Aaa Cat CTT Gac att gTG atg TCA Cac	1630	170 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gin Asn Pro Giu Gin Giy Leu Giu Gac cat gca att cac tgg gic aaa cag aac cct gaa cac ggc ctg gaa 910	916
430 Ser Pro Ser Ser Leo Pro Vel Ser Vel Cly Glu Lye Val Thr Leu Ser TCT CCA TCC CCC CTA CCT GTG TCA GTT GCC GAG AAC GTI ACT TTG AGC	1678	200 190 CC49VHP- GAI GAI ITI AAA IAC AAI GAG TEG AXI GGA IAT ITI CTC CCC GGA AAN AAD AAD TAA TAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	958
Cys Lys Ser Ser Gin Ser Leu Leu Tyr Ser Giy Asn Cio Lys Asn Tyr TGC AAG TGC AGT CAG AGC CTT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAG TAC 49LFR2(-)- G	1726	ANE PHO LYS GIY LYS ALA THY LOU THY ALO ASP LYS SOF SOF SOF THY AGG TIC AAG GGC AAG GCC AGA CTC ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGG ACT 1006	9001
460 470 470 470 470 470 470 470 470 470 47	. 1778	230 Thr Sar Glu Asp Ser Ala Val Tyr Aca TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT	1054
486 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Tac TGG GCA TGC GGT AGG CAA TGT GGG GTC CGT GAT CGC TTC ACA GGC	1822	PHE CJS The Arg Ser Leu Ash Met Ala Tyr Try Gly Cin Cly Inc Ser Tic Tot Aca aga Tcc CTG Art Arg Gcc Tac TGG GGT CAA GGA Acc Tca Tic Tot Aca aga Tcc CTG Art Arg Gcc Tac TGG GGT CAA GGA Acc Tca	102
		F1G, 7D	
FIG 7F		250 Vel Thr Val Ser Leu Ser Alm Asp Asp Asp Lys Lys Asp alm Alm	
490 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Wal Lys Thr Adī GCA ICT GCG ACA GAI IIC ACT CTC TCC AIC ACT CTG AAG ACT	187.0	CTC ACC CTC TCC TCA CTA AGG GCA GAT GAG AAA GAG GCA CCT 1150 Lys Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Lys Lys Lys Lys Lev Can CTT TCA GAG GAT GAT	
510 Glu Asp Leu Ala Yal Tyr Tyr Cys Cln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu CAA GAC GTG GCA GTT TAT TAC TGT GGG GGC TAT TAT ACC TAT GCC CTC 530	1918	Lew Cin Cin Ser Asp Air Ciu Lew Yel Lyp Pro Ciy Ale Ser Val 176 Cao Cao Ter Cac Ger Gao TTG Cre Aia Der Cog Ger Tea Gro	,
Afl II The Fbe Gly Ala Gly The Lys Lou Vel Leu Lys *** The I ACG TIC CCT GCT GGG ACG CTO GTG CTT AAG TAA AGT AGG GAT	. 9961	300 310 Lys lie Ser Cy Lys Thr The Thr Asp Bis Ala lie AAG ATT TCC TOC AAC CT TCT GCC TTC ACT GAC CAT CCA ATT 1294	_
TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA SQP1- TGT AGA ATG TAT TTC AGT PENPTSEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT	2014	HIS TEP VEL LYS OID ASD FOR GIN OID LAY GIN TEP IIS GLY TYF CAC TOO OTO AAA CAC AAC CCT CAA CAC GGC CTC GLA TOG ATT COA TAT	
ATC ATT CTC CGG CAA TGG TGT GGG CTT CAT CAT GTG AAG AAA AAC GCG AAA ATC	2062 2110	330 Phe Sor Pro Gly Aen Aep Aep Phe Lys Tyr Aen Glu Arg Phe Lys Gly TIT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TIT AAA TAC AAT GAG AGG TIC AAG GGC 1390	_
GGG III IIG IGG AAA ICA TAG GGG AAI GGG IIG GAI IGI CAC AAA AII Berei i CCC AIC C-3*	2158	350 Lys Ale Thr Leu Thr Ale Asp Lys Ser Ser Thr Ale Tyr Vel Cln And GCC ACA GTG GCA GAC AAA TGC TCC AGC ACT GGG TAC GTG CAG GA	_
		370 Les Ann Ser Les Thr Ser Clu Ann Ser Ala Wel Tyr Phe Cys Thr Arg crc AAC AGC CTG ACA TGT GAC OAT TGT GGA CTG TGT GTG AGA AGA AGA 1486	









神奇(内容に変更なし)

CC49 I.G. SCFV2 & SCFVの総合アッセイ 総合因子:ピオチニル化CC49 IIG

1,5 2-4,9

6.6

10C 5 C12H15/15 C07K18/29 C12H15/62 A61K19/395

According to the state of the s

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO SE RALEYANT

25 Herch 1994

WO.A.91 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 Occember 1991 see arample 1

×---

مره پیش ایرانیوسی در جال بیشبانی سیست می بیا مشهور به باید ایشید با دو دو ایرانیوس بیا مشهور رسی به بایسی می استشار به ادار

The second secon

27 -64- 1994

Cupido, N

平成8年 9 月 1 日

## 特許庁長官 高 島 章 段

1. 事件の表示

PCT/US93/12039

2. 発明の名称

多価の一本的抗体

1 特正をする者

事件との関係

特許出願人 ·

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

4. 代 選 人

住所 〒105 東京都港区北ノ門一丁目8番10号 静光北ノ門ビル

青和特許法律事務所 電話 3504-0721

氏名 弁理士(7751)石 田



5. 精正命令の日付

自発補正

- 6. 補正の対象
- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
- (2) 図面の顔飲文
- (3) 委任状
- 7. 補正の内容
- (1) 明細書、請求の範囲及び契約書の翻訳文の浄書(内容に変更なし)
- (2) 図面の翻訳文の浄書 (内容に変更なし)
- (3) 射紙の通り



•

	国 聚 錦 査 報 告	PCT/US B3/12039
	BOCCHIENTS CONSIDERED TO BE LEVANT	70.703 93/12039
	Dates of Statests, and Stateston, where appropriate, of the reference purposes	Marine in the Prin
Y .	SIDCHEMISTRY vol. 30, no. 92 . 22 October 1991 , EASTON, ANY 2 - 10125 H. N. PANTOL LAND ET AL. 'Conformasional ALBERTON, Ye folding and digand-binding affinity of single-chain Py immunoglobulin fragments anyroused in Secherichia coli' clad to the application see page 10120, column 1, paragraph 2	2,4
•	EP,A,O 506 124 (TANOX 8103YSTEMS, INC.) 30 September 1992 see memple 4	. 2,6
P,X	MO.A.93 11161 (EMZON, 1HC.) 10 June 1993 see figure 19A	1,8-6

<u> </u>	图 京 桐 1	. * *	PCTAS	91/12039
Printer description about the course proper	7-1	Patent fact		**************************************
VO-A-9119739	26-12-51	AU-A EP-A	7883191 0486452 1280899 1502039	07-01-92 27-05-92 24-08-82 15-04-83
EP-A-0506124	30-09-92	AU-B- AU-A- JP-A-	640863 1299292 1117164	02-09-93 15-10-82 14-05-93
VO-A-9311191	10-06-93	AU-A- 1	178993	28-06-03

page 2 of 2

## フロントページの締き

(51) [nt. Cl. 6		識別記号	庁内整理番号	FI
C07K	16/46		8318 -4H	
C 1 2 N	15/09	ZNA		
//(C12P	21/08			
C 1 2 R	1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載 【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//(C12P 21/08

C12R 1:19

[FI]

C12P 21/08

9358-4B

C07K 16/00

9356-4H

16/18

9356-4H

16/32

9356-4H

16/46

9356-4H

C12N 15/00

ZNA A 9282-4B

季能簡配各

非 丽 化 丑

平成9年 7月 2 日

特許庁長官 龙 井 寿 先 尉

1 事件の表示

平成6年特許期第511437号

2. 病正をする者

要件との関係

神許市原人

名称 ザ ダウ ケミカル カンパニー

3. 代 包 人

年新 〒105 東京都港区北ノ門三丁目 5 書 1 亨 北ノ門町森ビル 青和青野荘体事務所 福富 03-5470-1930

**浜名 弁理士(?751)石 田** 



L 補此対象書類名

明都曾及び領求の範囲

5. 有正対象項目名

明朝春及び諸水の荷面

6. 無託の内容

- (1) 明和音を創紙の通り描正します。
- (2) 前求の配置を選集の通り前正します。
- 7. 旅付書類の当録
- (1) 引 和 老
- (2) 門束の範囲

1.75

本発明は一本類の多種抗体に例する。

多価の一本館抗仏

依体は、身体が含本物であると利断する特定の抗原又は物質に応言して免疫系により断離されるイムノグロブリンの静に属するタンパク質である。5 クラスのヒト技体があり、各クラスに同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は円体体、又はその複合体であり、影像と重義とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより或る。延敏は一本の可変(V:ドメインと・本の定念(C)ドメインとより成り、他方、重報は一本の可変性ドメインと、3 本以上の定常ドメインとより成り、他方、重報は一本の可変性ドメインと、3 本以上の定念がよりとより成る。延想及び重額の両名に由来する、それぞれで、及びドルと称される可食ドメインは、イムノグロブリンの特別性な決定し、他方、定常くC)ドメインは機体なエフェクター機能をもたらず。

アミノ放配列データーは、それぞれの可定ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FB)によりフランクされている3つの相応性決定領域(CBB)を含んで成ることを示論する、このFBは可変領域ドメインの標準保合性を提得するものと考えられている。この CDRは個々の債体の結合物異体にとって重要であり、且の依体の特合の多機能の原因であると想定されている。

- 抗体の基本検急は2本のヘナロダイマーを含むため、抗体に多曲分子である。 例えば、 1gGクラスは2つの同一の抗原的合部位を育しており、他方、五量体 / gHクラスは1のの同一の結合部位を育している。

関一の遺伝系列及び結合物理性を有するモノクローナル技体は特新及び指導的 の関方として寄まとされている。モノクローナル抗体は、確立された手頭に従い 、マウスのリンパ類と割当なマウスミエローマ概拠系との融合により作られたハ イブリドーマにより日常的に受出される。しかしながら、ヒトにおけるインビが 指揮及び診断にとってのまズミ技体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒン は一マウス技体あるに基づき割約されている。

キメラ気体であって、一の様に由来する技体の特合义は可覚領域が別の種に由

果する数字の定等で取り起きされたものが延長 18%方法論により作られている。 例えば、 Sabaggook J. Laminol. 1875: 1086 1074 (1980) : Sunら、Ficul Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987) : Nithibarra ら、Canner Res. 47: 1899 -1005 (1987) : 及び Lieら、Froc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3439-7443 (1987) : を参照のこと。これらは静脈暗線病がに対するキメラが体を弱以している。 典理的には、ネグも技体の可変領域は上下技体の定常数域に連結されている。 かかるキメラ抗体にその起域において大部分が上下であるため、それらはネズに技体よりも免疫資金が実質的に低いるのと予測される。

キメラ状体は、洗液解合にとって必須でないが、その裏型動力学に影響を及ば すタンパク質構造な体のうちの主要部分を模成するに関域を保存し続けている。 免疫療法又に免疫診断における抗体の利用のため、集的破壊に迅速に集中し、且 つ結合する充体権分子を持ること、及び未結合の負責が及体から通過に即称され ることが希望される。一般に、小さめの抗体フラグメントに高めの配管浸透性を 守しており、そして悪き状体とりも身体からより早く解放される。

状態と地気作用するのは軽額及び電路の可変低減であるため、一本の $V_{\rm L}$  と一本の $V_{\rm R}$  としまの $V_{\rm R}$  としまの $V_{\rm R}$  としまの $V_{\rm R}$  といったにより、これに $V_{\rm R}$  つい。とによりはベブナドリンカー(米面特許等  $V_{\rm R}$  4.946.778号)により選絡された $V_{\rm R}$  ールー $V_{\rm R}$  ボリベブチドモ放しており、ここでLはベブテドリンカーを載している。 $V_{\rm R}$  と $V_{\rm R}$  ドナインが医向 $V_{\rm R}$  ・  $V_{\rm R}$  である $V_{\rm R}$  が集  $V_{\rm R}$  5.32,405号に関係されている。

完全資体にとっての最少限の2つの結合領面と述べてはFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の場合部位を含む抗体に比べて扱い活性を育している。

従って、このボリベブチドの所性を高めるため。同っての抗咳が毒骨性を制持 又は高めるため、球費の結合部位を有するsuftの頻繁はを得得することが有利で あろう。加えて、機妙超戦上の別々のエピトープの接続を可能とする、別の免疫 ニフェクター機能の技体ペース所増を可能とする、又は治療もしくは診断成分の 技体接触を可能とすることが否則である多倫scitを維持することが否則であるう

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有粘合している一本のValid 一本のV

## 国際の商品で設備

図 1 は、 $V_{k-1}$ - $V_{n-1}$ - $V_{k-1}$ - $V_{k-1$ 

**翼2は CC49V<sub>L</sub> (SEQ 15 NO: 1) のヌクレオナド配列を示す。** 

503は CCAOV (SEC IL NO: 2) のアミノ放配列を示す。

図4は CC49V<sub>m</sub>(SEQ IC NO: 3)のメクレオチド配列を示す。

図5は CC49V<sub>N</sub>(SEQ JE NO: 4)のアミノ酸虹列を示す。

関 G は p49LBLE(SEQ (D NU:G) におけるCC49―本顔抗体UN.Nのアフレオチド 配列及びアミノ酸配列を示す。

関7は p49LBBL(SEQ 16 No: 8)におけるCC49―本類抗体LDHのスクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSLSO(T及びpSL3018Tの精築を示す。

以9はプラスミド pt9LHBLの構築を示す。

图FOはプラス:ド p49LHLHの構築を示す。

関いはCC491gG、CC49xcFv2及びCC49xcFvを用いた、競合図子としてピオチニル化、CC491gGを用いる競合アッセイの結果を示す。

本明明書で挙げた金での文献の表示全体を引用することで本明語者に征入れる

複数、アミノ酸、ベフチド、発度は、低性基準を配すとき、それらに1874に 10 8 (Cumnission on Biologics) Nomenclatory)又は開連分析の実際に使って時している。

本明和音で用いる。一本値抗体フラグメント』(acPo)又は「抗体フラグメント」なる類は、 $V_{\rm L}=U_{\rm L}$  により扱わされる。ペプチドリンカー( $U_{\rm L}$ )により  $V_{\rm L}$  ドメインに連続された  $V_{\rm L}$  ドメインと合かポリペプチドを意味する。 $V_{\rm L}$  と  $V_{\rm L}$  ドメインとの順序は進せあってよく、 $V_{\rm R}=U_{\rm L}$  としておわされるポリペプチドが確保でもうる。(ドメイン)は、後立の検納、例えば頻原店会又は妖魔の過失及はナタンパク質のセグメントである。

「多価一本鏡杭体」はペプチドリンカーにより共存結合した2以上の一本顔依

、ドメインとを有する一本競技はフラグメントは、既二ペプチドリンカーによって共作符合されて、完全が体の結合機和力を結停している多値、本題が体を形式であうることが発見された。一思様において、本処例は抗康に対する動和性を有する多価・本動抗体であり、ここでこの多価・本動抗体は2本以上の単額可度ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの利の可変ドメインに連続されている。

到の態快において、本発明は2本以上の一本類以体プラグメントを含んで吸る 多価一本観状体であり、位フラグメントは抗対に対する観和性を行しており、こ こでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そ して各フラグメントは:

- (a) 軽銭可変ドメインを含んで成る第一ポリペプデド;
- (b) 重数可変ドメインを含んで致る第二ポリペプチド:及び
- (c) この第一と第三のポリペプチドを摘旋的な結合性成分へと複様せしめる 第二ペプチドリンカー:

### をなんである。

期の影響において、本発明に、多価一水原は似をコードする CRA配列を操作し、ここでこの多価の一本観技体に2本以上の一水原式体フラグメントを含んで成り、名フラグメントは採尿に対する抵抗性を育しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

- (a) 経緯可変ドメインを含んで或る第一ポリペプチド:
- (b) 重額可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド;及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる 第二ペプチミリンカー:

## を含んで成る。

この多価一本値抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より記念ら名管透過を可能さする批体フラクメントの情報を可能とする。 多価一本側指体は、統合部位が2種類の抗療決定量でありうる多価一本機関体の構造も可能とするであろう。

体フラグメントを意味する。この穴はフラグメントは連結されて、

Va -1-Va -1-Va -Va

のり、とり、アメインの紹介を有する二個の一本銭抗体を形成してよい。

三国以上の一本額の多値技体は、適面のペプチド間リンカーによって二面の一本額技体に連結された!又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な整様においては、V、とVェドメインの数は等しい。

本幹部は、

| 84 -t-84 -L-91 -t-91 X (d. 81 -1-81 -t-84 -t-84

## で表示されうる多価の一本鎖抗体を提供する。

 $\forall i \in L_i V_i = L_i V_i \in L_i V_i \in L_i V_i \in L_i V_i = L_i V_$ 

本身別において利用するための一本能比はフラクメントは任意の技体の超減及 びプ又は直接可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽値と重視可管ドメ インは万一の抗原に特異的である。違述されて多価の一本核抗体を構成している 個本の抗体プラグメントは、同一の抗康に対して特異的でありうるか、又は影け の抗原に対して体質的でありうる。

一本鏡の多低抗体についての OKA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする適倍子の起線が必要とされる。適当な OKA配列は公允の起駅 から人手するか、又は当業界に合知の類準の予順によって獲得できる。 別えば Tur U.S. Departural of Brillia and Human Servicesにより公開された Kabat らのSepuraces of Fictures of Lamanological Interest 複4度(1991)は、今日まで述べられているロンムとのは以前を開始の配列を展示している。

適位子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンする『MAの原原として、値 核写学案仲介合成によりmEEAのら獲得したcUMAB2列を利用することが一般に可能 である。試体に関して、mEBAの必要に広範囲にわたるハイブリドーマから獲得で きうる。例えば、カクロダATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Co (thru Collection, 20%9 Parklars Jrive, Rockville Rd., TSA (1930) を参照のこと、その中になけられている信息に根本な技能と反応性のモノクローテルに体を分述するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、モして不発明において利用である。これらの解除条及びその他の類似の確似が、可能ドメインをコードするmixAの配数として、又はモノクローナル技術と外のアミノ静を列を決定してもために仮体タンパク情を監視するように利用できろうる。

情体の可愛域様は、適当な専得動物、波なは家語動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その疾気度は問題の放映であるか、又はハブチンであるとも、キーホールリンペットへでンフェン(KLH) の如きの特点に対するこのハブチンの抗原性体合体であろう。無症化は位主哺乳動物への通常は2~3週間匿ちの免疫域の1又は依留の繰り返し計劃によって好適に実施されうる。通常、最後の負責の3日後、野藍を取り出し、そして600(か当治界に公園の機事手順により関連に管得できうるようにハイブリドーマを使するための役割を会に利用する最後制度と経費する。

調脳の技<mark>状が歪得でき。そしてそのアミノ 腹配</mark>発だけを知り得たら。その配列 を遊覧写することが可能である。

本独別において有用なり、放びり。ドメインは外をしくは、1920年3月3日に 全物された PCT用版 90 80/04410 及び1989年1月26日に公開された PCT用版 90 83/09382 に関バされている。 技術報道権ナンバク質でが原に対する「適のほど 依依の一つから確認でする。 とも弁ましいのは、アケン質 70 90/04410 及び 70 88/00592 においてに移とカラされているモノクローナルが体に出来するり、及び 9、ドメインである。CC490 9、をコードするアクレオチド配例(SBQ 10 MG: 1) は図2にボナものと実質的に同じである。CC490 9、のフトノ酸配列(SBQ 10 MG: 2) は図2にボすものと実質的に同じである。CC490 9、のフトノ酸配列(SBQ 10 MG: 3) は図4に示すものと実質的に同じである。CC490 9、ページャンのドルグに関いてある。CC490 9、ページャンのドルグに関いてある。

本発明の依体フラグメント及び多様の一本鎖式体を形成するため、適当なペプ チドリンカーを得ることが必要である。 $V_R \stackrel{\cdot}{\subset} V_{\cdot}$  ドメインを連結するための進

含まれる。…般に、かかるベッターは前生観然と適合性な機に中来するレブリコンとコントコールを残さを含む。このベクターは通常レブリコン略位。及び形質 転換無限の中での表現型選別を視することのできる特定の違気子を保育している 、例えば、大陸国(f. coll)はpR0202を用いて容易に形質を始めれる( Bclivar も、Gens。 2. 95-(1977)又はSurbrok 6、Mo'ecular Clashuz Cold Sprica E arbor Press。 Jew Tork 第 2 版((1889) )。

真値和数にとって適当なプラスもども利用できうる。S. セレビジス(S. cere visitet)又は一般のパン解母が資格数主要の中で最も一般的に利用されているが、数多くのその他の体、例えばピシア パストリス(Pichie pastoris) が有用である。多様次体物、例えばAFCにより入下できる \$P2.70 又にナナイニーズベムスケー部属に出来する推奨の培養物も街主として利用できたる オ乳動物細胞にって適当な典型的なベクタープラスとグロ \$P32aco及び p522gpt(ATCC); OSU 及びp55%() (Patala)、pBPV- ( /pill24 (International Diotechoclosy, Inc.) である。

本報明のポリペプチドについての遺伝子を発送するための類核及び真核り々れ ス発現ペクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本類の多価技体をコードするインサートは、その 挿入迷路部において適合性制限部位を育し、亘つその研究等位が作人の領域にと って固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンド メクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、別えばSambrockら、質視 に配数の方法によりくゲートする。

本発明の一本観の多価数体の製造にとって好温なベクターの遺伝・構築体は、 構成的に急性な短写プロモ・ケー、新生一本使用リベブチドの合成/無趣の外へ の分泌を誘導するシグテルペプモドをエンコ・ドリを閲覧を含むものである。好 ましくは、その危限値度は、不溶性物質としてそのボリベフチドが存取すること を避けるために確認、いりたたみ及び無味過程とつり合う。 レブリコン及の実か トロール配列に加えて、一本識ポリベブチドの量度な合成にとって過なのである。 必要とされたる。これらの要質にはスプライスングナル、並びに転写プロモータ ・エン・ハンサー、各で味たシグテルが含まれる。更に、適知の遺伝で及びその 当なりンカーは、Va とV。ドメインが、一本様ポリペプチリであって完全気体のもとの構造に非常に観報する三次元構造を育し、使ってその核体フラグメントが由来しているだけなどを会議ない場合を選集を存得しているだけペプチン類へと手りたたまれることを可能にするものである。scPyを破壊するための連当なリンカーは、モイメノグロブリンフラグメントのV。及びV。ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイスノグロブリンフラグメントが日来している先をは体の結合特異性を保持するような三次構造を育するように、2以上のallyを連結することの可能なものである。第2回の特色を育するリンカーは、その開始者を引用することでは明確を記した。12世代は、12世代に関いの方法により機様できうる。この形に946、174号に記載の方法により推修できりる。この形に946、174号に記載の方法により機様できりる。この形に946、174号に記載の方法により推修できりる。この形に946、174号に記載の方法により推修できりる。この形に946、174号に記載の方法により作るれたボリペプチド記判より、ボリベプチド名主によりを

野ましくは、 $V_{\pi}$  と $V_{\tau}$  ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、 2 以上のscFvを連結して多価の一本酸抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を育する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その値々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗烈な職所他の結合作力を妨害しないように そ加されていることも必要である。

打造なリンカーは、PattolissoののBlochex、20。 0117 - 19125 (1991) に関係されている2050と称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にある Taol Bがと、他端にあるBind a 都位により指定されるコギンを現由に変えられている。

好達なリンカーのアミノ酸配料(SEQ 13 NO: 5) は下紀の通りである:

Leu Ser Ale-Asp-Ass-Ala-Lya Lya Asp Ala Ala Lya Lya-Asp-Asp-Ala-Lya Ly x-Asp-Asp-Ala-Lya-Lya-Axp-Leu .

このリンカーは一般に10~50のアミノ酸疾帯である。好ましくは、このリンケーは10~30のアミノ酸熱量である。より好ましくは、このリンケーは12~30のアミノ酸疾基である。母も好ましくは、このリンカーは15~25のアミノ酸疾基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが

年段物が実成及び折りたたみを助反するために必要とされうる (シャペロン)。 市服まれているペクターはベクターにとって上足の基準を減かすように関係に 収度されうる。かかる改変は入手できる首物及び本明和音における数量により、 労働者によって軽易に変換される。

更に、このフローエングペクターは選択マーカー、例えば菱剤新性マーカー、 又は宿主網路による選別できる特徴の発度を引き起こすその他のマーカーを含む ことが好ましい。「宿主相部」とは、起鉄 UNL技術を用いて構成されたベクター により根據内に移覚を失されうる細胞である。資料に核ズにその他の選択マーカー マルカリ によりのであるを多数性動長することを実施する。更に、選択マーカー、 例えば原料所性マーカーの存在は、次鉄酸生物が受力をの中で類別すること的 ぐうえて利用されらも。この管接において、かから解析の形質に換削縮の始慢的 は毎年化におに発発された機関率を必要とする条件のもとで細胞を抽費すること により即られるであるう。

本発明の間似及び帰載は特別所に公知の標準技術を利用して地改されつる。例 えば、おしそれるか特殊特地の中に分泌されるなら、この一本類の多価以体は限 外達通により透幅されつる。そのボリペブキドが塩十年核のペリプラズで空間へ と構造されるなら、特徴はその相似に提通圧ショップを与え、次いで限外延過、 採取アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用 いらカラムプロマトグラフィー及びゲル連通も実行することにより速収されつる。不溶性であり、且つ温析体(refractile bodies)、連修計入体として存在して いるポリペプチドは、関語の溶解、料入体を単勝するための変心と流移の扱り返 し、例えばグアニジン一門ドによる可添化、及び高度の好りたたる、それに新く 生物体は分子の特別によって併取できりる。

一木飯の多鉛坑体の指性は当葉界に公知の標準アッセイ、例えば設合アッセイ 、原素総合免疫収替アッセイ(RLISA) 及びラジオイムノアッセイ(RIA) により度 定できうる。

本発明の多番の一本格技体は診断及び治療に対ける利用に関方の利点を執する。この多種の一本層技体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に関る散奏くの利益を誘する。それらはその類的制能によれば減に制造し、そ

して身体からより迅速に排験される。

お野及び/又は治療用途のため、この多価の一本機体体は1又は複数の妨保フラグメントが協助収録に対して特別的であるように、及び/又は複数の枚保フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特別的であるように精致されうる。

本幕明は更に、第の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な時に計断 れる報題也成的も考慮しており、ここでこの場的抗原はしばしば印跡の表層上で 発現される。物斯及び/又は治療用途のため、この多価の 本額抗体は連当なイ メージ又は治療研に当須昇に介知の方法によって治合されうる。本類明の基理法 成的は当系界に公知の方法、例えば情帯の場合。溶解又は凍納や湯工器によって 森質される。

本発明を、その単なる例示を並図する下記の実施例の考慮により更に切らかに する。

## 4 16

80(? 5ープロセーミークコローターインドイルホスフェート

10 运基对

Bia-Triaプロパン (i、3 - ビス(トリス(ヒドロキシメチル) - メチルアミ

ノ) プロバン)

BS4 - 华血湾アルブミン

COR 机箱件决定领域

3LISA 酵素結合色投収着アッセイ

392 非共有一本鉱料ダイマー

111 夺電点電気休息

Ibp キロ塩基対

LO Luria Bertael 将难

Mab モノクローナル抗体

BES 2 ー(N-モルホリノ)エクシスルホン酸

117 分子卷

VBT ニトロブルーテトラブリウムシロリド

オリゴー オリゴメクレオチド

## プラスしょ

<u>pSCPV (IIII)</u>: 2にのアミノ取りンカーにより連結されている、CC48の写真を勧さ CC13可変重数とより成るscPvについてのコード配列を含むプラスミド。

<u>MSDANA 文は protent</u>;CC495c7y2 LHE3文にUHL年収物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

## 货花例

## <u> 经关级</u>

分子クローニングのための手履は、その関示内容を引用することで本明担当に 個入れる。Saxbrookら、 Moleculas Cloning. Cold Spring Farber Press, New York即2版(1888)及び Ausmbeiら、Cerrent Priocola in Moleculas Blokez. John Wiley and Sons, New York (1882) に記載の手段である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

## <u>オリゴスクレポチ ドの台成及び境</u>膜

## 發展資素消化

制限酵素消化は全て、Dethesda Research Laboratories (Gnithersburg, MD).

PAG ポリアクリルアミドゲル

ポリアクリルアミドゲル電気休息

PES リン酸硬粉食塩水

PCk ポリメラーゼ連続反応

oSCFV SCFVをコードする CNA配列を合むプラスミド RICS ラジオイムノガンド外科

NIC ラジオイムノ治療

scFt 一本株Ftvイムノグロブリンフラグメントモノマー

schus 共有結合した一本籍的イムノグロブリンフラグメントダイマー

SDS ドデシル銃酸ナトリワム

108 トリス級衛合塩水

トリス (トリス(ヒソロキシメチル)アミノメタン)

TOBS ツイーシ20次浄液

Vu イムノグロブリン重領可灸ドメイン

Vs イムノグロブリン報貸可変ドメイン

## 抗体

PAGE

CC19: ヒト陸郵間連絡タンパク質72(7A0-72) に特別的なネズミモノクローナル技体: ATCC No. ED9454として寄まし

CC49PA3 :重額のN、水塩保板に連結している完全経額より扱るCC49の抗媒結合性保板。

CC49sqty: ペプチドリンカーにより連続されているCC49抗体の二本の刊変ドメインより成る一本関抗体フラグメント。

(C497v2: ダイマーを構成するように非共育結合している2つのCC49acFv. 7v の後ろの数字は、表示の分子のラノマーサブニニットの数を思味する。例えば C C497v8に大量体の多量体を無味する。

<u>(CLASTUPY2</u>: 3つのリンカーにより连結されている、2本の CC49V、ドメイン と 2本のV。ドメインとより成る共有結合費一本額技体フラグメント、V。(L) とV。(II) ドメインとも連結し合わせるのに 6つカ可能な場所の組合せがある: LBLM, LBM, LLGM, BLEM, NTMとびEGALL。

New England Biolabs、Lac. (Ecverit, M.) 又はBocarioger Mancheim (BK. Lai isaspalia, IN)の産業及び研究法を用い、その製造名の程度する事実に使って実施した。別化された出版物をポリアクリルアミドがい地域深動(PAGE)により分類させた。そのゲルをエキックルプロミドで保险し、その DBAペンドを返送到たました。そのゲルをエキックルプロミドで保险し、その DBAペンドを返送到たこともの別別にさせ、次いでその DBAペンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのドリス、2 mMの所能、i adoptin、pH 8.9を含む透音デューブ(Unica Carbide Core. Chicato)の中に入た。そして Mas Subsariou 電対象動義語(Mor Par Scientific Instruments. CA)を用いて課題された。サンプル容量を Sueed Yaca首に対象の知识に対象を表現された。サンプル容量を Sueed Yaca首に対象のでは異なるに、3TOで下げた。 INAAマエタノール注版をせ、そして経済のCarbide Cara

## 農業結合免疫収費アッセイ(EL.SA)

Johnsonら、 Can, Res. . <u>46</u>. 850-857 (1983)に実費的に記載の通りに調製 した FAG-72抗闘を、ポリビニルクロリド98穴マイクロケイターブレート(Oyaa tech Laboratories, Inc., Chaptilly, VA) のウェルの上に一夜乾燥させること で破費させた。そのブレートを PBS中の1%の BSAで31でで1時間ブロックし、 次いで 200g 1の PBS、0.05%のツイーン50で3回たった。25g 1の試験抗体及 び25g 1のビオチニル化C(49:1/20,000希状率の :ag/alの溶液) をウェルに 加え、そしてそのプレートを別でで30分インキュペーとした。プレートに結合し た TAB-72、ビオチニル化6049、ストレプトアピジンアルカリやスファターゼの 相対量、及び発色的質は、会計な妨体又はビオチニル化CG49がないように、しか **もstRVによる競台を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定** した。場際コントロールはテルロブalopCrapなび10ルタブalocCC49Fab とした。 私性コントロールは PES中のし光の BSA及び/又はほLDとした。未結合のタンパ ク質を洗い渡した。アルカリルスファターゼの複合された1:1900の希釈率のス トレプトアピジン50 y 1 (Souther Blatechnolgy Assentares, Inc. - Birminglan 、礼)を加え、そしてものフレートを31℃で30分インキュペートした。そのプレ ・・トを更に3回走った。50xlのパラーニトロフェニルーホスフェート答准(Xir kegsard & Perry Laboratories, isc., Gaithoraburg, ND) を加え、そして発色 反応を厳低20分行わせた。 sefy2結合の相対最をマイクロブレートリーダー(No

Tecetar Devices Corporation, Manit. Park. (A)を用い101 - 450 moでの充字像 東スキャニングにより測定した。 scht/の結合は、発色の同時値でを伴うドオテ エル化CCI9の結合の低でをもたらした。

## SDS-PAGE及びウェステンプロッチィング

885-245R分析のためのサンプル(20ヵ1)を、非最元用やンプル類製バッファーSeprasol I(Integrated Separation Systematics)。 Matick、VA)の中で5分 技術神することにより開発し、そして、0-20K句をのポリアクリルでもや Dailo by Minusaiにその型の手の仏職事(ISS) に延って配せた。

| 磁気体験は、Ulp1 2ーゲル製造(ISS) モ州い、ゲル曲の55mkで、一定の環境で 約75分行った。ゲルモケマジーブリリアントブル・R 250 (Bio-Rad. Richnes 6 。 GA) の中でかなくたも I 時間毎色し、次いで映画した。分子量域準度は予め集 められており(Mid Range kit. Bis-rsified 3joiceb. Herton Center. 魅力、そ して下型のタンパク質を含んでいた。ホスホリラーゼリ、ゲルタメートデミドロ ゲナーゼ、オバルマミン、ラクテートデニドロゲナーゼ、炭酸でンとドラーゼ、 カーラットグロブリン及びチェッローム G、対応の分子量はされぞれ85.000、55 。000、43.000、38.000、29.00C、18,400及び12,430である。

ウェスタン分析を行うとき、デェブリケートのゲルも比勢した。電気体制数、ゲルの一方を場所パッファーキ 1 (9, 2Mのトリスー配1、pill (0, 4)の中で15-20分甲質にした。1xxxxxi 1 (0, 2Mのトリスー配1、pill (0, 4)の中で15-20分甲質にした。1xxxxi 1 (0, 2Mのトリスー配1、pill (0, 4)の中で15-20分甲質にした。1xxxxi 1 (2) をクグとした。その版を次に福福パッファーキ:の中で3分甲氧にした。※1111は10よ-SDE 装置(紙)111にの16・を、ゲルの中のケンパク理をこの扱に転写するために買いた。一滴の段極パッファーキ 1 (4の中に受した)を表した。新加工の場所ので、所属パッファーキ 2 (45mkの・リス、pill (4) の中に受した消息が、原格パッファーキ 2 (45mkの・リス、pill (4) の中に受したが、そして養女に稼べシステー (40mkのグリシン中の発調のトリス配1、pill (4) の中に浸した運動のでは大きなが、テースのは20分甲ン中の発調のトリス配1、pill (4) の中に浸した運動のシートを加えることによってサンドイッチを作った。をはは250mk の定産電池(初期電産は3~20ポル)に特別した)を用いて30分で活せられた。

## 李萬点雜包洗助(TEF)

華電原(pl)は、DBASCAS(Madison、Pl)を介して大手できる PRDIZIN-TITEA 使という名のコンピュータープログラムを用いて検定した。入力してある配列に よるアミノ酸症点に関づき、pliに加えて場合が得られた。 cps資本は電荷に寄与 するため、 Cpsについてのけ数は c に調整し、ながならそれらは全てジスルフィ ド結合に関与するからである。

実験的にs1を、laggolアガロース IEFプレート、IB域 3 ~10 GFXC31 approducts.
Rockland、ME) を思いて決定した。Biored Bio-pacresis 水平電気体動をルを、
IEF を行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。製資水動条件は、 500 で
ルト (関係)、 26m2の電波及び13Wの定案電力とした。等電点決動は 90miので
でした。 IEF展型品はShiradより購入した。そのキットはフィコシアニン、ターサットタロプロシB、中央駅プレドラーゼ、LD設プンとドラーゼ、B、5 でビンとトへモダロビンA及びC、3 レンチルレクテン及びキトクロームじを含み、それとの引動された55、5.10、6.00、6.50、7.00、7.10及び7.50、7.80、8.00が近にも 20及び8.50である。ゲルを、 PXCにより供給された仕様書に従って全合及び解色した。

## C[48抗体機の定量

プラットした後、その職を水の中で簡単にすすぎ、そして20x1のプロッキング 消技(トリス級新食権水(TBS)中の1%の土血液アルブミン(BSA)(Signa、St. La uls、 NO): を有する四の中に入れた。TBS はFictor Chemical (Monkforc、IU)よ り、子得料素を来たして関人し、500mlのみを加えたとき、その混合物は25mlの トリス、0.15Mの塩化ナトリの人類後、pl. 1.6を模する。これらの調を扱少限 I 時度、周囲出度でプロックし、そして20mlづかの 0.3所のツィーン20洗浄液(TT 88) 生用いて5分間3回流った。1780を軽数するにに、0.5ml のツィーン2015 ig na)を 733のリッケー当り浮合した。使用したプローブ技体は20mlのビボテール 化 FAIO 14溶液とした(10mg 2/20mlの技術がファー)。技術パッファーは J OmitのCITS(当り 2の BSAを加えらことにより作った。周円品度で30~60分プロ ープした後、その職を上配の過りTT65で3回点をかった。周円品度で30~60分プロ ープした後、その職を上配の過りTT65で3回点をかった。周円品度で30~60分プロ

次に、その優を周囲速度において30~60分、次次パッファーの中で 1:500 年 東部のアルカリホスファケーゼの指合されたストレプトアビジン(Socilars Ita technology Associates、Birgington、41) 20ml とインキュペートした。余浄工程を上記の置り、この映画り返した。発色反応の前に、映を放映アルカリパッファー(20ml) の中で2分使った。このパッファーは 9.1Mの放映水素ナトリウム、1 mmの 東に1。Hulo、比4.8とした。アルカリホスファケーゼにとっての証券を存るため、ニトロブルーチ・ラソリウム (1811) クロレド(cduzg、Signa)を78ため、ニトロブルーチ・ラソリウム (1811) クロレド(cduzg、Signa)を76ため、ニトロブルーチ・ラソリウム (1811) クロレド(cduzg、Signa)を76ため、ニトロブルーチ・ランリウム (1811) クロンド(cduzg、Signa)を76ため、ニトロブルーチ・ランリウム (1811) クロンドインボルホスフェート(301P) (25mm) を301に 100%のジメチルホルエアミドの中に始かした。これらの形のジメチルホルエアミドの中に始かした。これらの形のジメチルホルエアミドの中に始かした。これらの形のシメチルホルエアミドの中に始かした。これらの形といるに、700ででは、700ででは100mlのファルカリ治波に加え、そして15分別反応させ、次いで発色質からそれで洗い流した。

## ピオナニル化 PAIS 14

FAIJ 14は、CC49に対して時期的な、47CC No.CRI/10256として存託されている まズミの広ーイディオタイプ抗体(1862a. Kアイソタイプ) である。 FAID 14を Nygena Protein Aアフィニティーカラム(Yonkora, NY) を用いて精製した。製

185、scFV7の種老よび単量はいわを含む複製CC4S株体はすべて、適合している 1.0cm比路長の石製製キュペット(Heilas社)および Perkin-line: V/7%分分 先地更計552/列モ州いて、タンパク質物材象の 280mm後異光の根光度を対定して 定量した。モル吸光係数(Ea.)は、各抗体について、下紀式を用いて判定した

E = = (Try数) × 5,500 + (Tyr数) × 1,340 - ((051) 2 数) × 150 - (Pax数) × 10

これらの値は、B.B. Vatilzeler, Advances in Protein Chemistry, 17後、 3万 ~378 真に配数されている情報に基づいている。

## 高性能液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を複製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチケンまた以チフロン製配管を用いた LEC UPLC システムを使用した。このシステムは、2150型がMCはシブ、2152型製物器、 270mの保光度に設定された UV CDBE SII 2233 製物出版圏および2231型 Seperâte Fraction collectorであされている。

## サブユニットの PCRによる製造

## 9<u>4-2=2</u>

100mmのベクター BTAおよび対応する::) 化光電温的当量のインジート DKA を用いるサゲーション反応を、Stratagene社(米国、カリフォルニア州、ラ・ホ ーヤ所在)のT4 LTAよりガーゼキットを刊い、数メーカーの指示にしたがって行った。リザーション反応数(全容値20ヵ L)は最初18でマインキュペートし、次いて一夜4年まで参々に冷却した。

## 形質素的

砂質転摘は、100 u L のStralagene社の大暴臨(F. co. t) 161 コンピテント卸 他(米国、カリフォルニア州、テ・ホーヤ所在のStralagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上足リゲーション反応的由来の組入(1~5 μ L) を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、没合を飲むさからルリアプロス(LB)中で3TCで1 時間再生させ、使いて、pSCFVIDL、645LINEもしくは 243JIRLに月いる20pg メプロのクロラムフェニコール合著 (CAM26) エリア意天上にプレートしまたはプラスミドが5331を含有するクローンもしくは581301由来のその後の機能が用いる 100 u g / sl.アンピシリン(AMP10C)ルリア等天プレート(LB・AMP100)上にプレートした。

## 大腸内クローンのスクリーニング

細菌プラスミドは、 Process 社(米国、ウィスコンシンボ、マディソン所在)
の Magicミニーブレッププラスミド製造チットを用いて、海太王 (selection pr essere) そ植物するため識切り塩素の含素作るARプロス県長物からは難した。こ のキットはメーカーの意味い塩料等にしたがって使用した。

## プラスミドの静物

piをLOLEでよび pign.ELLとの名された 2 数のブラスミドを、多値の一本館抗体 を製造するために特殊した。 pign.Eを含分する高主報点に、 V. -L-V. -L-V. --L-V. で表すことができるボリベブデドを確定した。ここでV. とV. 12CCSS抗体の経験と真偽の可能振復であり、およびリンカー(L.) は、Fiz SEQ IN 8D: 5の配発を有する25項のブラン酸のリンカーである。

g49L間Lを含有する宿主組動は、 V、・l・Va -l・Va -l・Vi で表すことができる

来した。陽色プローブであり、かつ8ヶ811 および Kin-1 による消化物由来の 201 母の連葉対称人形形(図点に示す1958~2165の模様対(bpi)を含有するクローン を1953年111 とあるし、次いでは497年に対するメラレオチド配利を含有するクローン を1953年111 とあるし、次いでは497年に対するメラレオチド配利を含有する954301 訂を構築するのに選択した。FAbli - Bandi Penty - i スーターを1953のi中に所 置した理由は、その Stellを3millの部位の間のボリリンカー領域中に存在する 3cc47回制限ニンドスラレア・ゼ銀位を除くためであった。このことは、 8cc47 回航空が、構造体中に多差はVを報告配要するのにユニータである必要があるV 、とV。の解析を続いて構造するため設計された。各Vの観析 Bcc47回 - Shell 報位に付加されると、Ecc47回は各場合に設備されて、ユニータ深入所持に入っ てくる次の Bcc47日毎日と形成した。

V. 配列は、PCR性値の単的として PSUPY JAMARAN、オリブの5 \* ACYLと S \* オリゴSCP5によって PCLで作製した。SCP1に対するDNA 配列(SEO 10 NO:10) とSCでに対する DNARF列(SNO 10 NO:11) は次のとおりである。

SOP1 : 5' -TAMA CTC CAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SOP5:5' TAMA GOT ACC ACCA ACC CAT TAU ICA GCA GAC CAT CAC TGA GCT-3'
下稿をつけた部分はエンドメクレナー共列級機位を示す。

増幅された Ve DAA を、1分の PAG、地域作品、エクノールによる比較および CD M L XXへの溶解によって複製した。そのVe E MAC X Rel と Rel と の物質の素で消化し、同じ免尿酸素で消化され速いて精製された pSL3017ペクターに対するインサートとして周いた。 塩塩のリゲーション反応を行い、次いで一部分(イム L) を用いてコンピチント人販賣 NG I 根状を形質を改きせた。 形質に持された類似を、LB AMP100海アプレート上にプレートした。 CCASV。 インサートを含むしていることを示す。質問アフローンを Nite I および Abe I 消化スクリーンから取出した。

United States Dischenical (USB) 社 (米国、オハイオ州クリーブランド所在) のSequence Eil、および配列決定用プライマーのSLOGISEQB (pSLOGIベクター中) 、 Tho I 都位から571) 止速においてアユールした216の配列決定プライマー) と CCASYMPを用いて、8所4 の配列決すを行って、 (CASYMPを用いて、8所4 の配列決すを行って、 (CASYMPを用いて、8所4 の配列決すを行って、 (CASYMPを用いて、8所4 の配列決すを行って、 (CASYMPを用いて、8所4 のでのアラスと呼ば

ポリペプチドを産生した。こゝでV。とV。はCC/S資体の新熱と重額の可変転換であり、およびしは上記アミノ発配列を育するペプチドリンカーである。

CCLGV. して.-1\_v. -1\_v. -1\_v. (p49:31M) のスクレオチド配列(SEO [) NI: 6) とフミノ助配列(SEO [) NO: 7) を図るに示す。 (CASV. -1, V. 1.-V. ( p19(LBH.)のメクレオチド配列(SEO [) NI: 8) およびアミノ設定列(3X0 [) NO: 0) を図すに示す。

## oSL30181の母母

pSL9Gilfrの複数を図るに示す。パシラス・サベニフィルミス:Bazillus lichen liforris)のペニンリナーゼド(znnP) ナーミス・ターの配列を、 3hc l むよびBs 離1で45分間消化することによって、 pSCFV [Molechelen にプラスミドから攻助し、電気放動を行った後、65%ポリアクリルアミドがから切取り、電気溶動させ、エタノールで放動させ、次に、同様に製造されたペクター: pSL931 (米図、カリフェルニア州、サンディエゴが走のlavitreset社) 中の同じ部位に連結した。 pSCFV [Molechelen に対して manage for psu manage fo

上記のリゲーション反応物の一部(3 μ L)を、LB・AMPI 00事業プレート上に プレートしないで、皮膚瘤させたコンピテント大場構が1 間間を形質転換するの に用いた。scaf ターミネーター、インサートを含有するボテンシャルクローンを 、 Fazrmania社(米国、メリーランド制、ガイサーズバーグ所在)の T7 Quicky rime \*\*\*P OKA構造キットと、Buluweisら、 Sucleic Arid Reararch。 17巻、 452 買、1980年に記載されているマイクロ故によるシロニー治療があどもに用いてス クリーニングした。ブローブは、penf - Nhe I - Bank I ターミネータープラグメ ント当体であるが、Quickprimeチットによって提供された指示によって構造し

pSL30(- WILTおよびpSL30) ・FL対の更容を構築するときの出発点で使用した。使用した配列決定型のポリゴをことに示す。

pst3015EQR(SEQ [D NO: 12) および CC48Y= (34Q ID NO: 13) のオリゴメクシオチド配列は次のとおりである。

PST3012053: 2, ACC LCC CM1 LVC CCY YCC LLY 3,

COLUMN : 0' -GAT GAT TTE AAA TAC AAT GAS 3'

## 実施例 1- つ4利用用 の構築

pSL3JIHT(5 <math>p(g) を出発物質として用い。これを Rco47世および 恥ゃ! で消化し、大きい万のベクターフラグメントを除製した。 CC49% 挿入ソラグメントは、5 \*\* オリゴとして SCPGCも用いかつ 3 \*\* オリゴとして SCP5を用い、 PCにによって軽減した。 SCF6Bのヌクレオチド配列(350 13 N3:14)は下記のとおりである。

SCREETS" - TALKA TOU COA CAT GAC COX AND MAN GAC COA COT ANA ANA CAC GAT

COC ANA AND CAT GAC GOC AND MAN GAT CITY CAS GIT OND THE CAG CAC

TOT-G"

またナリゴ SCPGBはリンカーのコーディング教徒の一帯(S80 IC MO: 1400m6~76) を含有している。 pSCFF E脳中のCC4Dで3時のでアニールするよう収だされた数オリゴの部分は、S80 IL MO: (4中の5077-90由来のものである。

下算をつけた配対は Pap I 郵位に相当する。違された PCPインナートを可載し、 Pap I と Abe I で流化し次いでpSL301MI Scot7回 - Abe I ベクケーとのリゲーション反応物(3 μ L)である転換を行うのに用い、LH - Ade POC編天プレート上にプレートした。pSL301MI 生成物を示す止しい大きな J Mo I - J Abe I インサートを育する 2 個のクローンの配列をすり「300円と用いて次定し、上しい配列(以7 のスケレオ・デ1124~1543)を育する単クローンをその後の構造に用いるのに進んだ。SCT1のスケレオ・デ HEM 1893 I 7 VI: 150 は下記のとおりである。

SQP1: 5' "TO ACT TEA TOT AND ATG ATG T-3'

破終のリンカーマ、サゾユニット(balō44~1663、初1)は、5' オリゴの S CP7bと3' オリゴの SCP4sを用いかつ PCRの無的として pSCFY UDAを用いて解放 した。 SCPTEのメクレオチド配列(SRQ ID NG: 16) は下記のとおりである。

SCP76: ST -TANN TOO GOA GAT GAO GOA AAG ANN GAO GOA AAA AAN GAO GAT GOC AAN AAG GAT GAG GOC AAG AAA CAY CYT GAD AYT GYG ATG YGA GAG COT GO

下級をつけたスクレオチドは Pop 1 部位である。 SCP&1のスクレオナド配列(8-89 (1) NO: 17) は下記のとおりである。

SCHRS : 2, -1899 EEL VOC ALL LIS CAT VVC

CAG CTT GGT CCC-3"

下算をつけた最初の「個は Nhc 1 郵位に初当し、もう一つの確定 A(1) 郵位に報当する。 \$CPT0のヌクレオチドミー76はリンカーモコードし (図 7 のヌクレオチド34(~16:2)、一方で、にアニールするヌクレオチド??ー93は図 7 の16:2~16:35に称当する。プライマー SCPSa(2、その 3) 米端の粒かいチール、 Nhc I 同 関都位、終止コドレ、 A(I II 制限郵位および V、 の表達の2:4個の地球を含有している。 Fas I と Nhc I による増化の役、この得られた (20))のインケートを特別して複製が51,308IIでイクチーの Nhr I と Ecu47回の軽値に連結1、接続的なプローンを Rac I と 180 T でスクリーニングし、 近しい大きさのインサートが確認されたの4(51F12 (一) と50PIで配列が決定されて、19513013BLC中に好たに挿入された配列が確認された。そのスクレイチド配列(580 18 50:18) に下記のとおりである

48LFR2 (-) : 5' -CTO CTO GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミドゥS 3311版にを Xho T および Xhe I で前化し、複製し、得られた1176 bp V。・リンカー・V。・リンカー・V。・リンカー・V。・ダグメントを a SCPV LINIに連続して j 49LBELを製造した。 なおこの pSCFV LINIは同じ前版酵素で切断されその大きいガ のフラグメントを育製したものである。 そのリゲーション式の生成物(4 ュ 1 新分)を削いてコンピテント人類例Ab I 框型(Straigesath)を影響を持たし、166A型C 変犬プレートにプレートした。 正しい制限酵素性型を育するプラス:「そち すて単クローンを、 p49LINIにを含わさせるために選択した。 p49LRELは、CC49 多低一本類次体 a GV2: V<sub>2</sub> -1-V<sub>3</sub> -

りは次のスチップで格正され、オリゴSCPGC (SEQ 10 %0: 21) の末期に日塩茶の欠美を組込むことにによってp8L301HTが製造した。

SCPSC: 5' -TA<u>AGEGECT</u>SATGATGUTAAGAAGGACGECGGGAAAAA CGACCACSCAAAAAAGATGATUGAAAAAGATCTCG AGETTAASTTGAAGGATCTCGG-3'

SCPSC中の下線をつけた配列は Eco4TTT部的に担当する。 PSRにおいて、 SCP 6Cは5 \* オリコとして用いられー方 SCPIGは3 \* オリコとして用いられて、リン カー CCC4F、セグメントが生成する。 SCPIG のメクレオチド配列(SR) ID NO: 22 ) はべまのとおりである。

SUP10  $\epsilon = 6^\circ$  -The figurance the light the arg against that

CTC AGG TT 3 '

SCP10中の下級をつけた配列は図6のメクシオチド1988~1985は見られる Nbe I 部位に報当する。この場合、PGアンサートは Rbe I だけで消化されないで情報される。ベクター(qsL301HLT) は Eco47世命位(光に形成されている)および Rbe I 耐位で消化されないで特別された。そのインサートとベクターは認結され、その一部会(3 μ l.) を使ってコンピテント イー・コリムG1 無格を形質転録した。この形質転換電板をLB-A版PLGCプレート上にプレートしないで挟続的フーンを Ibo I と Nbe I でスクサーニングにた。エニい大きさの DMAを存する3 何のクローンを得た。これらのクローンのうちの 2 機は、オリゴ499LCDR3 (一) セよびSQP1をよいて配列を決定した。そのタフレオチド配列(40VLCDR3 (一) の 6 %0 10 70:23) に下記のとおりである。

499LCDR3 (1) : 5' CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を育する一つのクローンが得られ、そして図りのタクレオチド1533~1963からの記列が確認され、近しいp5L30(BUILクローンを示した。

大機菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLHを製造するために、p8130LMBT(f n g ) を khrl hr Hol であれし、次いで Vm ·L·Vi ·L·Vi 配列を含有する小さい方のインサートを積製した。この所片を、p3CFV UMf 5 p g ) を Hao I と Mae I で俯れして得た大さい方のベニューフラグメントの検討物と連邦した。上記退時混合物の一郎(4 n l ) を使ってコンドチント大級商AG I

支先例2: MSLILEの構造

549MIRAの機能を超<u>10</u>に固式的に示す。リンカーVこのサブユニットをランオ リゴの SCP7&と3~オリゴのSCP9で製造した。

SC29: 5' -TAA AGE THE CHE CHA GEE OFT HER PTO

AGC AGC AGC TTG GTC CCA G 8'

SC27bオリゴ (ステレオチドる〜76) は図6のリンカーをコードし (ステレオチド1124〜1192に相当する) および図6のVょのフテレステド1193〜1215に相当する。 PCRに対する pSC57 (EM機能 (ステレオチド77〜99) にチュールした。

SUPPIC、 Nmc 1 部位 (第一のド韓をつけたタクレオナド) と 2co4 (日 部位 (第二の下級を付けたタクレオチド) を有し、これらの際位は次のV 領域を受けるための p8L301世代を心るのに必要な展展等位である。3cPPDのメタレオチド18~25世 図 6のスクレオチド1502~1557 (リンカーの最初の 2 館のアミノ機をコードしている) に相当し、一万ヌタレオチド22~46は、 PCRにおけるSCPG (SRQ 18 30 : 19) のアニ・リング環域である図 3 に示すヌクレオチド308~1531に把当する。プラスミドPSL301所を Bud11日と Nbc I で消化し、もしてもの大きい方のベフターフラグメントは無数して、予め fsp I と Wat I で基因され機能である。その連結総合物 (3 ½ 1、2 を用いて大幅のロンビナントが始を影響を振ってより、15c I ではかけ、15c I ではいて大幅のスターン・15c I ではかけ、15c I ではいて大幅のスターン・2 ではいて大幅のスターン・2 ではいて大幅のスターン・2 ではいて大幅のスターン・2 ではいて大幅にないませんが、15c I ではいて決定した。そのスタレオチド配列(SCQ 10 税) 20) は下記のこともである。

5" TTG ATC ACC AAG TEA CTT TAT G 3"

配列決定の結果は、得られたか5130[町クローン中に PCRの調まりと欠失があるということを示した。図6にみられるメクレオナド1533~1537に相当する5億の地盤の入夫がうとめられ、そして下であるべきはずのメクレオチド1531は DTAEL 内のデータから問題したところ実際にはGであった、得られた配列は、

5' ... GAAGGGGTT ... TA . E.

こゝで下舗をつけた配列は偶然に EcotT直移位を形成した。図 6 のACCCCTの配列 はメクレオチド1530、1531、1532、1538、1539および[549に相当する。この出き

機能をが質味液した。移られた形質転換度合物をは−CMD20 プレート上にプレートし、次いで p403.EEに対する代表的なクローンを、正しい関係酵素地図 (図10 季期) セエび TAK T2に対する主動所作に基づいて昇充した。

実施術 3 CC49 x5Fv2のごHUBとLEOEが共有結合したご旦体の特製

CC49の共育結合した一本銀二量体(scPv2) の特別を行うために、大腸頭のベリ プラズマ釈迦質の自分を、 p4HLHLBと p491.既Lの声音の 1,3Lの一夜特芸物から 調製した。姿勢すると、精養物を 25CmLづつの 4 部分に分割し、Sorvail GS 3 ロータで10分間 5900rpuでは心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、 30歳 MaClを含有する10mlトリスーIIC! pH 7.5からなる 100m中に再懸測させた。極瞭 を再びペンット化し、合計 100mLのS0mVとリスー#C! a33 で洗浄し、そして一つ のチューブにブールした。このチューンド、10w/vがのスクロースを含有する 30mMトリスー301 pH 7.3(100mL) および10mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を抵加した。 得られた混合物を、時々報婚しながら、室温に10分間発行した。英強性細胞(b) pertopic cell)を育記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを 与えて、彼ペレットを20mlの水倫 O.Saki kg01;中に途やかに悪趣させ、次いで時 **ヶ岳横しながら水上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化** し、大品館の周辺柏鉛質の両分を含有する上語み及を、 0.2μmの Nalge社(米 15. ニューラーク州、ロチュスター所在)の成過鏡筒で減過することによってき らに清査にし、次いでAnicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在) のCentriors 30およびCentricon 30で 1.0mlより小さい容積まで最適した。

e/folkilaicht p(filmilのクローン由来の機能用の相談質のショケート(thet kate) を、Pharmacie社(米国、ニュージャージー州、ビスカタワニイ所充)の Superfec 75 fR 10 / 750 fFLC カラム (手め P18で存在させたもの) に注入した。 観音 EUISA域で削すする場合、開題の主成物は 0.531/分の運量で2:~24分 放放市させた。 活性場合をブールし、允に述べたようにして連続し、次に、シスケル500 Microdialyzer Unit (Pierre Chraicalti) を開い、機能疾患3~4 何度 大ながら8000Mがカットオフ度を使用して、20mil トリスーのCI eH 7.6に対して一夜 通明を行った。そのIX科を PharmaciattiのHoan 9 Hz もが5 アニオン文物FFLCがラムに連続した。 保証機 人とく20mil トリスーのCI put 7.6年用い、要額検 Dとし

て20Mトリス-RCI pB 7.6 FC 20 为2CI モたいる均配プログラムを、 1.501/mi a の検量で使用した。問題の生成物は、映合 3LISA治で初だする場合、る々3~4分別でクラスから放出させた。この時点の両分の、二つの 5DS・PACEデルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリリアントブルー3250で吹色し、使力のゲルはウェスタン分析(プローブ結体としてビオチニル代 PAID 14を使用、に移されたが、3C7/2CILILIまたにはLINIに)の種の計算分子量の甲ーパンドが、5E.239プルトンの位置に出現した。活性直分は冬場合義整し、5DM 4DS 0H 3.8 に対して一次遺析し、次いで Pharmacla がのNeso 3 取 ミノラカチオン交換カラムに注射した。この複製スチップからの関連のコンの面景の5人6 は、 3DS 1AG 法とよびでこれらの回分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで重分さらはように構力する場合、気配数の発来の開始される面前に設出された。これがマでしたの回分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで重分ともはさらに模型するものにブールした。

None Qカラムを居住Vice S町分について再変使用したが使用した原葉液は20ml トリス・HC1 pd 8.0であり、泥量は 0.8ml/分に低するせた。 生成発出カラムと の結合なして放出されたが、None Sに残っているぐ転物がわずかにあり、したが って分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成数は均衡であり収扱 の特殊が20ために特別した。

### 穿戴点双氢体的

構築物の等類点(pi)は DRASTAR社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所 在)のコンピュータソログラム Protein-tittesteを使用して予測した。アミノ登 様成、顕名よび91年にあずいて計算した。

**試験では、old、PRC Biogrodacts社(米国、メーシ州、ロックランド所在)** のismxel (IPアント > Bi面前3--10を使用して制定した。上記 (IFFを実許するために、Biorac社 (米国、カリフォルニア州、リッチャンド所在) の最良成動智賞を、上記時メーカーの格学にしたがって使用した。その報意の身の条件は、20m元で 500V (限定) 対よび一定電力の10Vであった。等項高級学練動は30分別であった。 で 500V (限定) 対よび一定電力の10Vであった。等項高級学練動は30分別であった。 プレた。 Bioracは1 の 1割割単品は、フィコシアニン、タラクトグロブリンと、ウットがパズェックアンとドラーゼ、ヒトカルパニックアンとドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3 組のとフマメンクチンおよびシトナロム

機能的な抗原粘合部位をもっていることを示している。これは、単量本の個に比べて全 lsGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、xcPx2分子が、その CC451xcの数と関係に、免疫治療 月遊の穀物であり、毛質血管連過性の増大および一層逆点な事は分を心震動動物の 利点を有することを示している。この利点によって、異なの「20分子に止って、 本発明の化合物は多数回途射することができ、かつ場合意に用いる負受法認知に おいて無難:組作はなるですることができる。

本説明の他の実施管理は、水別構造を検討するかまたは本端に関示されている 発明を実施することから、当該比据分野の当業者にとって明らかになるであろう 。本明和者と実施例は何がだけを目的とするもので、本発明の質の金月範囲と思 想は以下の原水の範囲によって示される。

以上

じかき有され、p1億日もれぞれ4.55、5.10、6.00、6.50、7.00、7.50、7.80、8.00 0. 8.20 および 5.6であった。ゲルは FMCの投示にしたがって染色し製色した。 DMASTAR プログラムによって両方の MPS2の種のJ値として 8.1の種が予測された。 乗品の生成物に対し単一の第一なパンドがゲルトに、両者のVI成の 6.9の位 値にみとめられた。

lgG acPv2(UENHとよびUSEL)のような精製の19元体は、 280mm放長光の吸光 原を分光文学的に創定することによって定量した。モル吸光係数値は、は名々、 元に引用した Wellswicrの式を用いて測定した。

そのアミノ数組成に基づいて、COMBING、CC49xc7v2.HLB、CC49 scfv2.HEBLおよびCC49scrvのモ<sup>1-12</sup>(280nm) 使はそれぞれ 1,43, 1,65, 1,65 および1.71であった。

## 実施例 4

CC49scFv2の種の1EU9とLHHLの相対話使を、 IgGおよびCUUU未続にFLAGペプチ ドネガナる単分体なcFy叫と比較した。

パーセント融合(persont compatition) も下記式によって ELISAのデークから

ゼロ競合 試料部取り値 (30 405-45Gnu) ゼロ教会- 100分数会

## 路球の範囲

1. ②本以上の一本優は似フラデメン、を含んで成り、各フラグメントが成界に対する規和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有総合されており、この第一のペプテドリンカーが下記のアミスを配列

- Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lye Lye Asp Ale Ale Lye Lys Asp Asp Ala .rs - Lya Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu を育し、

そして各フラグメントは:

- (a) 経触可能ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (も)重数可数ドメインを含んで成る数(ポリペプチド:及び
- (c) この第一と第二のボリベアチドを検配的な結合性疾分へと連結せしめる 第二のベプチドリンカー:

を含んで成る、多価の一本株抗体。

2. 前近軽額可載領域が下記の配列

Asp I'e Val Net Ser Gin Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Cly Glu Cys Val The Leu Ser Cye Lys Ser Ser Gin Ser Leu Leu Tyr Ser Siy Asn Gin Lys Asn Tyr Leu Ale Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gily Gin Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ale Ser Ale Arq Giu Ser Gily Val Pro Asp Arg The Thr Gily Ser Gily Ser Gily Thr Asp Phe Thr Leu Ser ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ale Val Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gily Ale Gily Thr Lys Leu Val Leu Cye

と実質的に周じアミノ散配列を有しており、そして前配柱値可数低級が予認の配列

Giu val din Leu Cin Cin Ser sep Ala Ciu Leu Val Lya Fra Ciy Ala Ser Val Lya Ile Ser Cys Lya Ala Ser Gly Jyr The The Thr Aop Bia Ala Ile His Trp Val Lya Cin Aon Pio Glu Gin Ciy Leu Giu Trp lie Ciy Tyr Phe Ser Pro Ciy Ann Aep Aep Phe Lye Cyr Asn Glu Aig Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Vel Tyr Dhe Cyo Thr Arg Ser Leu Arn Het Ala Tyr Trp Cly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求順:記載の多任の一本線抗体。

- 5. 前田淳一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸紀列を有する、指求独・記載の多価の一本情点体。
- 4. 多価の一本値位けまってドする DMA配列であって、この多価の一本値位は が2.本以上の一本値位はフラグメントを合わて成り、各フラグメントが元気に対 する類和伝を育しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカ 一を介して共著結合されており、そして各フラグメントは:
  - (ε)軽値可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- 「(b) 重額可数ドメインを含んで仮る第二ポリペプナド:及び
- (c) この第一と第三のボリベブチドを製船的な結合性成分へと透得せ<mark>しめ</mark>る 第三のベプチドリンカー(

を含んで成る。 DYA配列。

5、毎記第一ポリペプチドをコードする配例が下記の説列:

と突貫的に向じてあり、そして前記第二ホリペアチドをコードする圧滑が下記の配針:

CAG OTT CAG TTC CAG CAG 12T GAC GCT GAG TTG GTG AAA GCT
GGG GGT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC
TTC ACT GAG CAT GGA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA
CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT CAT
GAT TTT AAA TAG AAT CAG AGG TTC AAG GCC AAG GCC ACA CTG
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GTG GAG CTC AAC
AGC CTG AAA ATC GAG GAT TCT GCA CTG TXT TTC TCT ACA AGA
GCC CTG AAA ATG GCG TAC TCG GCT CAA GGA ACC TCA GTG
GTC TCC TCA

と実質的に同じである。結束項4記載の MP配抗。